VOL. 112 IANUARIE - MARTIE 2008 ISSN: 0048-7848 Nr. 1

REVISTA MEDICO-CHIRURGICALĂ

A SOCIETĂȚII DE MEDICI ȘI NATURALIȘTI DIN IAȘI

Revista este inclusă în **INDEX MEDICUS** *și în* **MEDLINE**

Dorim să stabilim schimburi cu alte publicaţii.
On désire établir l'échange avec d'autres publications.
We wish to establish exchange with other publications.
Wir wünschen mit anderen Herausgaben den Austausch einzurichten.
Desideriamo stabilire scambio con alte publicazioni.
Déseamos establecer intercambio con otras publicaciones.

COLEGIUL DE REDACŢIE

Redactor şef
Valeriu RUSU

Redactori şefi adjuncţi
Doina AZOICĂI, Adrian COVIC, Norina Consuela FORNA, Gabriel UNGUREANU

Secretar de redacţie
Lucian Laurenţiu INDREI

Redactori
Secţiunea MEDICINĂ INTERNĂ - PEDIATRIE
Mihaela MUNTEANU, Ioana Dana ALEXA,
Corina DIMA-COZMA, Simona MANEA, Camelia COJOCARIU
Secţiunea CHIRURGIE
Emil ANTON, Radu DĂNILĂ, Radu MOLDOVANU
Secţiunea ŞTIINŢE FUNDAMENTALE
Cipriana ŞTEFĂNESCU, Carmen Lăcrămioara ZAMFIR, Eusebiu Vlad GORDUZA
Secţiunea MEDICINĂ PREVENTIVĂ - LABORATOR
Carmen PÂNZARU, Florin Dumitru PETRARIU
Secţiunea MEDICINĂ DENTARĂ
Irina-Draga CĂRUNTU, Gianina IOVAN, Irina GRĂDINARU
Secţiunea FARMACIE
Anca MIRON, Cristina Gabriela TUCHILUŞ
Secţiunea BIOINGINERIE
Alexandru Dan CIOCHINĂ, Gheorghe IACOB

Revista Medico-Chirurgicală (The Medical-Surgical Journal) is available in microform from University Microfilms International and is curently included in the major abstracting and indexing services.

*

Address for all authors:
REVISTA MEDICO-CHIRURGICALA
Society of Physicians and Naturalists
16, Independenţei Blvd.
P.O. Box 25
700098 Iaşi, 1, ROMANIA

Review copy books should be send only to the address above.

For reprint information in the United States contact:
International Reprint Corporation
986 Admiral Callaghan Lane 268
P.O. Box 12004 Vallejo, CA 94500
U.S.A.

Vol. 112/2008, Nr. 1

REVISTA MEDICO-CHIRURGICALĂ

A „SOCIETĂŢII DE MEDICI ŞI NATURALIŞTI" DIN IAŞI

REDACŢIA ŞI ADMINISTRAŢIA: IAŞI, BULEVARDUL INDEPENDENŢEI 16, 700098
Cont Banca Comercială Română filiala Iaşi RO72RNCB0175033604340001
Telefon 0232-216772; e-mail: rev_med_chir@yahoo.com

SUMAR

EDITORIAL
V. Rusu: Era imagisticii medicale (II) 9
MEDICINĂ INTERNĂ - PEDIATRIE
ACTUALITĂŢI
M. Covic, Maria Covic: Progrese recente în patogenia moleculară şi în tratamentul bolilor renale polichistice 11
Maria Isabela Belovici, G.I. Pandele: Calcificările vasculare mediale la pacienţii cu diabet zaharat tip 2 21
Cristiana Dragomir, Laura Florescu, Magdalena Stârcea: Nutriţia copilului cu greutate mică la naştere 35
S. Buzinschi: Incubation of the Coronary Disease. Pediatric Perspective 42
ARTICOLE ORIGINALE
L. Miron, Andreea Marinca, M. Marinca, Ingrith Miron: Cancerul mamar triplu negativ - spre o nouă entitate 51
S.A. Khder, Anca Trifan, M. Danciu, C. Stanciu: Polipii rectocolonici: caracteristici clinice, endoscopice şi histopatologice 59
Irina Brumboiu, G. Simionca, Ligia Ursu, Dana Savu, I.S. Bocşan: Caracteristici clinice şi ale profilului lipidic la pacienţii cu patologie cardio-vasculară gravă asistaţi în unităţi spitaliceşti din Cluj-Napoca 66
M. Mavros, V. Chiriţă, O. Popescu, Beatrix Ferencz: Polimorfismul genetic al genei MTHFR în schizofrenie 76
W. Kalefa, Diana Nicoleta Hodorog, Felicia Ştefanache: Tulburări neuropsihologice în hemoragia talamică. Studiu clinic 83
Tania-Elena Rusu, Alina Murgu, Evelina Moraru, Maria-Magdalena Florea, Ileana Ioniuc, Monica Alexoaie, Aurica Rugină, Stela Goţia: Osteopenia la copiii cu artrită juvenilă idiopatică 88
Codruţa Iliescu Haliţchi, Mihaela Munteanu, O. Brumariu: Factorii care limitează răspunsul la tratament la copiii cu anemie secundară insuficienţei renale cronice terminale 94
Olivia Dorneanu, Olga Filip, Irina Radu, Cristina Nicolau, Ioana Damian, V. Luca: Meningita cu *Cryptoccocus* spp. Cinci ani de experienţă şi revista literaturii 100
CAZURI CLINICE
Gabriela Coman, Nicoleta Mardare, Brînduşa Copăcianu, Maria Covic: Infecţie cutanată persistentă şi recurentă cu *Staphyloccocus aureus* meticilino-rezistent, varianta cu colonii mici 104
TEHNICI ŞI METODE
Mihaela Cătălina Luca, Cristina Mirela Petrovici, A. Vâţă, Carmen Dorobăţ, E. Năstase, V. Luca, Andra Teodor, A. Luca: Dozarea gama-interferonului în sânge şi în lichid cefalorahidian - metodă rapidă de diagnostic a meningitei tuberculoase 108
CHIRURGIE
ACTUALITĂŢI
Ionica Ciortan, D.G. Goţia: Algoritm terapeutic al scoliozelor idiopatice ale copilului 111

ARTICOLE ORIGINALE

R. Dănilă, E. Karakas, T. Osei-Agyemang, I. Hassan: Outcome of Incidental Thyroid Carcinoma in Patients Undergoing Surgery for Grave's Disease 115

S.T. Barbu, N. Rednic, M. Cazacu: Utilizarea drenajului percutan ecoghidat în tratamentul complicaţiilor septice locale ale pancreatitei cronice 119

K. Stamatiou, M. Danciu, C. Karakos, F. Sofras: Variaţia valorilor PSA la persoanele cu cancer de prostată în stadiu latent 126

D. Mârţu, Luminiţa Rădulescu, S. Cozma, A.I. Curcă: 7 ani de implant cochlear în Clinica ORL a Spitalului Clinic de Recuperare Iaşi 130

Cristina David, Ivona Lupaşcu, Simina Vegheş: Eficienţa "drilling"-ului ovarian percelioscopic la pacientele cu ovare polichistice şi infertilitate ovariană 136

G.S. Aprodu, V. Munteanu, Georgiana Filciu, D.G. Goţia: Anestezia caudală în chirurgia pediatrică. Experienţa noastră pe 150 de cazuri 142

CAZURI CLINICE

E. Crauciuc, Simona Niculescu, R. Balan, Nela Amălinei, Corina Flaişer, Şt. Buţureanu: Fibrom uterin gigant. Prezentare de caz 148

ŞTIINŢE FUNDAMENTALE

ACTUALITĂŢI

E.V. Gorduza, L. L. Indrei, Valeria M. Gorduza: Nutrigenomics in Postgenomic Era ... 152

ARTICOLE ORIGINALE

Simona Eliza Giuşcă, E. Carasievici, Fl. Eloae-Zugun, E. Târcoveanu, Irina Draga Căruntu: Modificări structurale de micromediu tumoral în metastazele hepatice ale carcinomului colorectal 165

R.G. Grigoriu, Raluca Balan, V. Rusu: Model animal de SDRA 174

O. Petrişor, Simona-Eliza Giuşcă, Maria Sajin, Gioconda Dobrescu: Expresia Ki-67 şi p53 în corelaţie cu gradul de diferenţiere al adenocarcinomului colonic 183

D. Ferariu, M. Danciu, Delia Ciobanu, Niculina Florea, V. Scripcariu, Maria Sultana Mihailovici: Limfomul gastric. Studiu morfologic şi imunohistochimic 191

Angela Dăscălescu, Mihaela Zlei, Carmen Aanei, Didona Ungureanu, Maria Ţepeluş, Cristina Burcoveanu, C. Dănăilă: Flow Cytometry-Based Quantification of Cytokine Levels in Acute Myeloblastic Leukemia (AML) Patients Plasma and Cell Culture Supernatants 196

T. Petreuş, Anca Indrei, Carmen Elena Cotrutz, C. Moşoiu, C. Cotrutz: Aspecte ultrastructurale în dezvoltarea nefronului uman. Studiu de microscopie electronică 203

M. Tanasi, T. Hârşovescu, B. Balmeş, C. Istode, Aida Mihailovici, D. Păduraru: Eminenţa arcuată a stâncii temporale. Aspecte descriptive 208

O. Fira-Mladinescu, Lavinia Noveanu, V. Ordodi, Corneluţa Fira-Mladinescu, V. Tudorache, Georgeta Mihalaş: Efectul expunerii cronice la fum de ţigară asupra funcţiei vasomotorii a endoteliului arterelor pulmonare de cobai 213

D. Păduraru, M. Zamfir, C.I. Stan, S. Luncă, L. Stoica, O.I. Motaş, Anca Indrei: Consideraţii anatomo-clinice asupra butonului celio-mezenteric 220

MEDICINĂ DENTARĂ

ARTICOLE ORIGINALE

Mihaela Hedeşiu, Cristiana Balog, Diana Monica Preda, G. Băciuţ, Mihaela Băciuţ, Floarea Fildan, Angela Pop, M. Maier: The Accuracy of Alveolar Crest Dimensions Measurement for Dental Implants. *In Vitro* Study 224

Lucia Hurubeanu, G. Băciuţ, H.Fl. Zeilhofer, R. Sader, Mihaela Băciuţ, R.S. Campian, H. Rotaru, Cr. Dinu, S. Bran, Cr. Balog, Ondine Lucaciu, A. Şerbănescu, Claudia Corega, M. Corega, I. Moldovan: Noi metode de reabilitare morfo-funcţională în despicăturile labio-maxilo-palatine 229

Anca Mihaela Viţalariu, Monica Silvia Tatarciuc: Studiu privind influenţa parametrilor turnării aliajelor dentare asupra pieselor protetice metalice 234

CAZURI CLINICE

Claudia Corega, Mihaela Băciuţ, M. Corega, A. Şerbănescu, G. Băciuţ, S. Bran, C. Dinu, H. Rotaru: Tratamentul combinat chirurgical-ortodontic la un pacient cu o anomalie Angle clasa II/1. Prezentare de caz 240

FARMACIE

ARTICOLE ORIGINALE

Gabriela Tătărîngă, Olivia Dorneanu, Eugenia Ştefănescu, Maria Dorneanu: Synthesis and Characterization of Some New Bishydrazones Derived fron Isatin 246

D. Lupaşcu, Cristina Tuchiluş, Lenuţa Profire: Cercetări în seria derivaţilor de semisinteză ai rutozidului. Sinteza şi caracterizarea fizico-chimică şi microbiologică a unor noi compuşi ai rutozidului cu izoniazida 249

Claudia Butnaru, Mihaela Pascu, Cornelia MIrcea, Luminiţa Agoroaei, Laura Solovăstru, D. Vâţă, Elena Butnaru, Zenaida Petrescu: Serum Zinc and Copper Levels in Some Dermatological Diseases 253

BIOINGINERIE MEDICALĂ

ARTICOLE ORIGINALE

O. Bredeţean, Al.D. Ciochină, O.C. Mungiu: Producţia de specii reactive ale oxigenului indusă de chemoatractanţi în neutrofilele umane. Rolul isoformelor protein-kinazei C .. 258

R. Ciorap, D. Zaharia, C. Corciovă, Monica Ungureanu, R. Lupu: Sistem de monitorizare a parametrilor cardiovasculari pentru conducători auto 263

Fl. Munteanu, Anca Munteanu, E. Bild: Evaluarea distribuţiei de temperatură tumorală în hipertermia superficială cu microunde prin metoda analizei cu element finit 266

DIN VIAŢA ŞTIINŢIFICĂ UNIVERSITARĂ

Norina Consuela Forna: Zilele Medicinei Dentare Ieşene 272

IN MEMORIAM

Prof. Dr. Mircea Zamfir 276

EVOCĂRI

Conf. Dr. Gheorghe Călin 278

Noutăţi: 20, 34, 75, 93, 99, 107, 118, 125, 147, 173, 182, 202, 207, 212, 223, 233, 239, 248, 271

CONTENTS

EDITORIAL

V. Rusu: Medical Imaging Era (II) 801

INTERNAL MEDICINE - PEDIATRICS

UPDATES

M. Covic, Maria Covic: Recent Advances in Molecular Pathogenesis and Polycystic Kidney Disease Treatment 11

Maria Isabela Belovici, G.I. Pandele: Medial Arterial Calcification in Type 2 Diabetes Mellitus Patients 21

Cristiana Dragomir, Laura Florescu, Magdalena Stârcea: Nutrition of Low Birth Weight Infant 35

S. Buzinschi: Incubation of the Coronary Disease. Pediatric Perspective 42

ORIGINAL PAPERS

L. Miron, Andreea Marinca, M. Marinca, Ingrith Miron: Triple Negative Breats Cancer - Towards a New Entity 51

S.A. Khder, Anca Trifan, M. Danciu, C. Stanciu: Colorectal Polyps: Clinical, Endoscopic and Histopathologic Features 59

Irina Brumboiu, G. Simionca, Ligia Ursu, Dana Savu, I.S. Bocşan: Clinical Characteristics and the Lipid Profile of the Patients with Life Threathening Cardiovascular Diseases Assisted in Different Hospitals from Cluj-Napoca 66

M. Mavros, V. Chiriţă, O. Popescu, Beatrix Ferencz: The Genetic Polimorphism of MTHFR Gene in Schizophrenia 76

W. Kalefa, Diana Nicoleta Hodorog, Felicia Ştefanache: Neuropsychological Disturbances in Thalamic Hemorrhage. Clinical Study 83

Tania-Elena Rusu, Alina Murgu, Evelina Moraru, Maria-Magdalena Florea, Ileana Ioniuc, Monica Alexoaie, Aurica Rugină, Stela Goţia: Osteopenia in Children with Juvenile Idiopathic Arthritis 88

Codruţa Iliescu Haliţchi, Mihaela Munteanu, O. Brumariu: Factors Influencing Responsiveness to Treatment in Childrens with Renal Anemia in End Stage Renal Disease 94

Olivia Dorneanu, Olga Filip, Irina Radu, Cristina Nicolau, Ioana Damian, V. Luca: *Cryptoccocus* Meningitis. Five Years of Experience and Literature Review 100

CASE REPORTS

Gabriela Coman, Nicoleta Mardare, Brînduşa Copăcianu, Maria Covic: Persistent and Recurrent Skin Infection with Small-Colony Variant Methicillin-Resistant *Staphyloccocus aureus* 104

TECHNIQUES AND METHODS

Mihaela Cătălina Luca, Cristina Mirela Petrovici, A. Vâţă, Carmen Dorobăţ, E. Năstase, V. Luca, Andra Teodor, A. Luca: Gamma Interferon Testing in Blood and Cerebro-spinal Fluid - Rapid Method for the Diagnosis of Tuberculous Meningitis 108

SURGERY

UPDATES

Ionica Ciortan, D.G. Goţia: Therapeutic Algorithm of Idiopathic Scoliosis in Child 111

ORIGINAL PAPERS

R. Dănilă, E. Karakas, T. Osei-Agyemang, I. Hassan: Outcome of Incidental Thyroid Carcinoma in Patients Undergoing Surgery for Grave's Disease 115

S.T. Barbu, N. Rednic, M. Cazacu: Ultrasound Guided Percutaneous Drainage of Chronic Pancreatitis Local Septic Complications 119

K. Stamatiou, M. Danciu, C. Karakos, F. Sofras: PSA Variations in Persons with Latent Prostate Cancer 126

D. Mârţu, Luminiţa Rădulescu, S. Cozma, A.I. Curcă: Seven Years of Cochlear Implant in ENT Clinic of "Recuperare" Hospital Iaşi 130

Cristina David, Ivona Lupaşcu, Simina Vegheş: Laparoscopic Ovarian Drilling in Improving the Therapy in Patients with Polycystic Ovarian Syndrome and Infertility ... 136

G.S. Aprodu, V. Munteanu, Georgiana Filciu, D.G. Goţia: Caudal Anesthesia in Pediatric Surgery 142

CASE REPORTS

E. Crauciuc, Simona Niculescu, R. Balan, Nela Amălinei, Corina Flaişer, Şt. Buţureanu: Giant Uterine Fibroma. Case Report 148

BASIC SCIENCES

UPDATES

Simona Eliza Giuşcă, E. Carasievici, Fl. Eloae-Zugun, E. Târcoveanu, Irina Draga Căruntu: Structural Changes of Tumor Microenvironment in Liver Metastases of Colorectal Carcinoma 165

R.G. Grigoriu, Raluca Balan, V. Rusu: Animal Model of Acute Respiratory Distress Syndrome 174

O. Petrişor, Simona-Eliza Giuşcă, Maria Sajin, Gioconda Dobrescu: Ki-67 and p53 Expressions versus Differentiation Degrees of Colon Adenocarcinoma 183

D. Ferariu, M. Danciu, Delia Ciobanu, Niculina Florea, V. Scripcariu, Maria Sultana Mihailovici: Gastric Lymphoma. Morphological and Immunohistochemical Study 191

Angela Dăscălescu, Mihaela Zlei, Carmen Aanei, Didona Ungureanu, Maria Ţepeluş, Cristina Burcoveanu, C. Dănăilă: Flow Cytometry-Based Quantification of Cytokine Levels in Acute Myeloblastic Leukemia (AML) Patients Plasma and Cell Culture Supernatants 196

T. Petreuş, Anca Indrei, Carmen Elena Cotrutz, C. Moşoiu, C. Cotrutz: Ultrastructural Aspects in the Development of the Human Nephron. Electron Microscopy Study 203

M. Tanasi, T. Hârşovescu, B. Balmeş, C. Istode, Aida Mihailovici, D. Păduraru: The Arcuate Eminence of the Petrous Portion of the Temporal Bone. Descriptive Features 208

O. Fira-Mladinescu, Lavinia Noveanu, V. Ordodi, Corneluţa Fira-Mladinescu, V. Tudorache, Georgeta Mihalaş: The Effects of Chronic Exposure to Cigarette Smoke on Vasomotor Endothelial Function of Guinea Pig Pulmonary Arteries 213

D. Păduraru, M. Zamfir, C.I. Stan, S. Luncă, L. Stoica, O.I. Motaş, Anca Indrei: Anatomo-clinical Considerations About the Coelio-mesenteric Button 220

DENTAL MEDICINE

ORIGINAL PAPERS

Mihaela Hedeşiu, Cristiana Balog, Diana Monica Preda, G. Băciuţ, Mihaela Băciuţ, Floarea Fildan, Angela Pop, M. Maier: The Accuracy of Alveolar Crest Dimensions Measurement for Dental Implants. *In Vitro* Study 224

Lucia Hurubeanu, G. Băciuţ, H.Fl. Zeilhofer, R. Sader, Mihaela Băciuţ, R.S. Campian, H. Rotaru, Cr. Dinu, S. Bran, Cr. Balog, Ondine Lucaciu, A. Şerbănescu, Claudia Corega, M. Corega, I. Moldovan: New Morpho-functional Rehabilitation Methods in Cleft Lip and Palate 229

Anca Mihaela Vitalariu, Monica Silvia Tatarciuc: Study Concerning the Influence of the Casting Parameters of Dental Alloys on the Cast Prosthetic Rehabilitations 234

CASE REPORTS

Claudia Corega, Mihaela Băciuţ, M. Corega, A. Şerbănescu, G. Băciuţ, S. Bran, C. Dinu, H. Rotaru: A Combined Surgical-Orthodontic Approach of a Class II/1 Maloclusion. A Case Report 240

PHARMACY

ORIGINAL PAPERS

Gabriela Tătărîngă, Olivia Dorneanu, Eugenia Ştefănescu, Maria Dorneanu: Synthesis and Characterization of Some New Bishydrazones Derived fron Isatin 246

D. Lupaşcu, Cristina Tuchiluş, Lenuţa Profire: Research Concerning Rutin Semisynthetic Derivatives. Synthesis, Physico-chemical and Microbiological Characterisation of Some New Rutin-Isoniazid Derivatives 249

Claudia Butnaru, Mihaela Pascu, Cornelia MIrcea, Luminiţa Agoroaei, Laura Solovăstru, D. Vâţă, Elena Butnaru, Zenaida Petrescu: Serum Zinc and Copper Levels in Some Dermatological Diseases 253

MEDICAL BIOENGINEERING

ORIGINAL PAPERS

O. Bredeţean, Al.D. Ciochină, O.C. Mungiu: Chemoattractant-Induced Reactive Oxigen Species Production in Human Neutrophils. Role of Protein Kinase C Isoforms 258

R. Ciorap, D. Zaharia, C. Corciovă, Monica Ungureanu, R. Lupu: Monitoring System for CArdiovascular Parameters of Drivers 263

Fl. Munteanu, Anca Munteanu, E. Bild: Superficial Microwave Hyperthermia Tumoral Temperature Distribution By Using Finite Element Analysis 266

UNIVERSITARY SCIENTIFIC LIFE

Norina Consuela Forna: Iaşi Dental Medicine Days 272

IN MEMORIAM

Prof. Dr. Mircea Zamfir 276

REMEMBER

Conf. Dr. Gheorghe Călin 278

News: 20, 34, 75, 93, 99, 107, 118, 125, 147, 173, 182, 202, 207, 212, 223, 233, 239, 248, 271

EDITORIAL

ERA IMAGISTICII MEDICALE (II)

Înainte de a continua să ne referim la o serie de aspecte generale ale domeniului imagisticii medicale, trebuie să semnalăm un mare eveniment editorial internaţional, de interes pentru întreg corpul medical, ca şi pentru studenţii în medicină. Astfel, în februarie 2008 a apărut la una dintre cele mai puternice edituri, *Springer - Verlag, Berlin - Heidelberg - New York*, ***Encyclopedia of Diagnostic Imaging***, în două volume: vol. 1 (A-K), vol. 2 (L-Z), împreună având 1963 pagini, 1334 figuri şi 143 tabele. Editorul acestei capodopere este profesorul *Albert R. Baert*, din *Departamentul de Radiologie* al *Spitalului Universitar Gasthuisberg, Leuven* (*Louvain*), *Belgia*, care a colaborat cu nu mai puţin de 449 de specialişti din toate domeniile imagisticii medicale, provenind din 25 de ţări, dintre care 18 din *Europa*. Cu regret constatăm absenţa *Estului european*, din fostele ţări ale lagărului comunist doar *Cehia*, *Polonia* şi *Slovenia* fiind prezente cu câte doi colaboratori.

Encyclopedia of Diagnostic Imaging a fost gândită şi redactată după toate regulile genului al cărui model ideal este *Encyclopedia Britannica*. Enciclopedia conţine aproape 4000 de intrări reprezentând concepte sau termeni de bază din imagistică în ordine alfabetică, legate între ele prin referinţe încrucişate. Ea constituie cea mai bună alternativă pentru orientarea asupra ansamblului metodelor şi tehnicilor imagistice. Şi implicit, pentru înţelegerea corectă, echilibrată a utilităţii diferitelor investigaţii ca şi a algoritmilor de investigaţie imagistică. Îndeosebi cunoaşterea procedeului imagistic de primă intenţie cu care trebuie să înceapă explorarea. Evident, cu condiţia ca algoritmii de diagnotic imagistic să fie atestaţi la nivel european şi să fie adoptaţi de toţi medicii practicieni. Dacă tehnica de primă intenţie nu este disponibilă, cum se întâmplă uneori la noi, va fi adaptată o soluţie care depinde de experienţa medicului specialist în imagistică.

Revenind la o serie de aspecte generale ale imagisticii medicale să observăm că în funcţie de caracteristicile informaţiilor obţinute metodele şi tehnicile se împart în ***structurale*** şi ***funcţionale***. În mod sugestiv se afirmă că metodele structurale reprezintă anatomia şi morfopatologia în imagini, pe când cele funcţionale înseamnă fiziologia şi fiziopatologia în imagini. Majoritatea metodelor imagistice sunt structurale, cu excepţia scintigrafiei clinice şi a imagisticii prin rezonanţă magnetică funcţională care permite, prin obţinerea unor secvenţe imagistice rapide, studiul difuziunii apei sau calitatea vascularizaţiei într-un teritoriu anatomic determinat. Cea mai nouă şi promiţătoare aplicaţie a *IRMf* face posibilă stabilirea unei cartografii funcţionale a creierului, prin localizarea modificărilor hemodinamice legate de activitatea neuronală care provoacă activarea unei regiuni encefalice. Cea mai importantă sursă de imagini funcţionale rămâne *Medicina nucleară*, iar datorită evoluţiei recente a aparaturii şi a radiofarmaceuticelor au devenit posibile şi imagini metabolice sau moleculare.

Când pentru un anumit organ se obţin mai multe imagini prin tehnici diferite, informaţiile obţinute sunt complementare. Iar pentru facilitarea interpretării, evoluţia informaticii a făcut posibilă fuziunea de imagini utilă îndeosebi în cazul imagisticii cerebrale. În mod evident, imaginea obţinută prin fuziune facilitează observarea modificărilor patologice şi interpretarea acestora. Mai mult, în ultimul deceniu a fost inventat primul dispozitiv imagistic hibrid *PET/CT* în care se asociază un aparat denumit cameră cu pozitroni sau PET (din engl. *Positrons Emission Tomography*) cu un com-

puter-tomograf (CT). În acest mod se obţin succesiv, pe de o parte imaginea funcţională-metabolică prin PET şi imaginea structurală prin CT a căror fuziune se va obţine datorită unui program informatic inclus în dispozitiv. Ca urmare, imaginile metabolice obţinute prin PET vor putea fi localizate datorită reperelor structural-anatomice realizate cu CT. De asemenea, este operaţional dispozitivul SPECT/CT în care se asociază o cameră SPECT (engl. *Single Photon Emission Computed Tomography*) ce permite efectuarea de tomoscintigrafii prin emisie gama monofotonică cu un CT. Neîndoielnic, seria dispozitivelor hibride va continua, ca şi evoluţia componentelor electronice a diferitelor aparate imagistice precum şi perfecţionarea mijloacelor oferite de informatică. Pe lângă faptul că nu este exclusă apariţia de noi metode şi tehnici imagistice, deopotrivă cu perfecţionarea celor existente. Doar un exemplu: sunt avansate cercetările asupra posibilităţii utilizării ca sursă de imagini a procesului de *bioluminescenţă*, care constă în generarea de lumină vizibilă de organimele vii, prin procese enzimatice (*sistemul luciferin - luciferază*). Datele experimentale obţinute până în prezent conturează posibilitatea obţinerii *tomografiei bioluminescente* datorită căreia se vor obţine informaţii la nivel molecular într-o diversitate de procese normale şi patologice.

Două aspecte extrem de importante asupra cărora ne oprim în continuare sunt: terminologia specifică imagisticii medicale şi evoluţia semiologiei din domeniu.

Într-o carte apărută recent, cu titlul *„Radiological English"* (*Springer*, Berlin - Heidelberg New York, 2007) autorii, *Ramon Ribes* (Hospital Reina Sofia, *Servicio de radiologia*, Cordoba, Spania) şi *Pablo R. Ros* (profesor de Radiologie, *Harvard Medical School*) observă că: *„The learning of radiological English is probably the most demading of all medical English by speciality. On the one hand, radiology covers the whole anatomy, physiology and pathology of the body, so radiologists in the years of residency, before getting involved in a radiological subspeciality, must be familiar with virtually all medical English terminology; there is no other speciality in which this happens"*. (op. cit. p. 3). Am preferat reproducerea acestui citat în engleză, ca alternativă mai convingătoare. Imagistica medicală este specialitatea în care limba engleză s-a impus în cea mai mare măsură, atât pentru faptul că dezvoltarea sa excepţională s-a produs după anul 1950, când engleza medicală se consacrase aproape definitiv. Mai mult, utilizarea mijloacelor informaticii atât în achiziţia datelor cât şi în procesarea acestora a însemnat şi adoptarea terminologiei informaticii care este exclusiv englezească. O reală dificultate o reprezintă existenţa în imagistică a două straturi ale vocabularului: • termeni tehnici din fizică medicală, biofizică şi informatică; • termeni prin intermediul cărora se descriu imaginile obţinute, îndeosebi modificările patologice. De unde dificultatea conceperii şi redactării unor dicţionare de imagistică (foarte puţine dacă se ţine seama de expansiunile imagisticii). Nu există un dicţionar care să cuprindă ansamblul vocabularului imagisticii medicale, cele existente fiind de obicei concentrate supra celor două straturi ale vocabularului, menţionate mai sus. Chiar în condiţiile anglicizării, aproape totale, terminologia imagisticii nu este unitară, iar unele cuvinte ţin de un jargon profesional care ar trebui revizuit.

Imagistica medicala a făcut posibilă şi apariţia unei semiologii specifice şi ea în continuă evoluţie şi schimbare. Cu speranţa că va fi acceptat de specialişti, iată un exemplu: excepţionala evoluţie a metodelor şi mijloacelor de endoscopie permite obţinerea unor semne şi modificări patologice, în diverse boli, sensibil diferite în raport cu cele observate când explorările se efectuează din exteriorul organismului.

Ne oprim, fără a încheia, numeroasele aspecte generate de imagistica medicală, una dintre cele mai importante direcţii de evoluţie a medicinii actuale.

Redactor Şef
Prof. dr. Valeriu RUSU

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

PROGRESE RECENTE ÎN PATOGENIA MOLECULARĂ ŞI ÎN TRATAMENTUL BOLILOR RENALE POLICHISTICE

M. Covic[1], Maria Covic[2]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Disciplina de Genetică umană
2 Clinica a IV-a Medicală-Nefrologie

RECENT ADVANCES IN MOLECULAR PATHOGENESIS AND POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE TREATMENT (Abstract): Polycystic kidney diseases (PKD) are common genetic disorders characterized by formation and progressive enlargement of cysts kidney, liver and other organs, leading to end stage renal disease. Regardless of the genetic defect underlying PKD, cystic epithelia seem to display common abnormalities: increased proliferation and apoptosis, loss of cellular differentiation and polarity, hypersecretion. The localization of multiples proteins, whose function are disrupted in PKD, in the primary cilium or at basal body at the base of the cilium highlight this neglected organelle as a common trigger of cystic diseases. Significant progresses have been made over the last few years towards a greater understanding of the molecular pathogenesis of cysts formation, particularly in the signaling pathways involved in cytogenesis: cAMP, mTOR, Wnt, Ras/MAPK. These advances have already brought several potential therapies targeting several key pathways of cystogenesis. **Key words**: POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE, CILIUM, SIGNALING PATHWAYS, CALCIUM, AMPc, mTOR, Wnt, MAPK, THERAPY

Bolile renale polichistice (PKD - de la *„polycystic kidney diseases"*) sunt boli sistemice, caracterizate prin manifestări renale (multiple dilataţii chistice bilaterale) şi extrarenale (hepatice, cardiovasculare ş.a.). Chiştii renali apar în perioada intrauterină, evoluează progresiv (ca număr şi volum) producând nefromegalie şi în final insuficienţă renală cronică terminală (IRCT) (1). PKD sunt a treia cauză majoră de IRCT, fiind prezente la 7-10% din bolnavii dializaţi (2). PKD sunt boli cronice, relativ frecvente (prevalenţa medie 1: 800 nn vii) (3) şi în marea lor majoritate se transmit ereditar, cu risc mare de recurenţă în familie. Datorită frecvenţei, afectării cronice multiviscerale şi evoluţiei inexorabile spre IRCT, care generează cheltuieli importante pentru îngrijirea bolnavilor, **PKD reprezintă o problemă de sănătate publică**. În aceste condiţii profilaxia lor (prin screening genetic populaţional) şi identificarea unor *ţinte terapeutice,* care să blocheze apariţia sau progresia chiştilor, devin prioritare. Progresele recente în elucidarea etiopatogeniei moleculare a PKD fac posibile aceste acţiuni necesare (2,4,5).

Cercetările moleculare efectuate în ultimii 10 ani în PKD, la om şi la diferite modele animale, au dus la identificarea şi clonarea genelor mutante, analiza structurii şi funcţiei proteinelor codificate de aceste gene şi în final la descifrarea defectelor în căile de semnalizare, care generează apariţia chiştilor renali şi progresia lor.

Pe baza patogeniei moleculare, PKD au fost recent regrupate în două categorii distincte. *Prima grupă* este formată din: boala

polichistică renală autosomal dominantă (ADPKD) - cea mai frecventă formă de PKD, boala polichistică renală autosomal recesivă (ARPKD), nefronoftiziile (NF) şi sindroamele cu chişti renali; toate aceste afecţiuni sunt generate prin *defecte diferite în acelaşi releu funcţional*, ce produce în final chiştii renali (2,3). *A doua grupă* (mai rară) include: boala renală chistică medulară şi boala renală glomerulo-chistică - care sunt produse prin stocarea *uromodulinei* (6).

MUTAŢIILE CARE PRODUC PKD

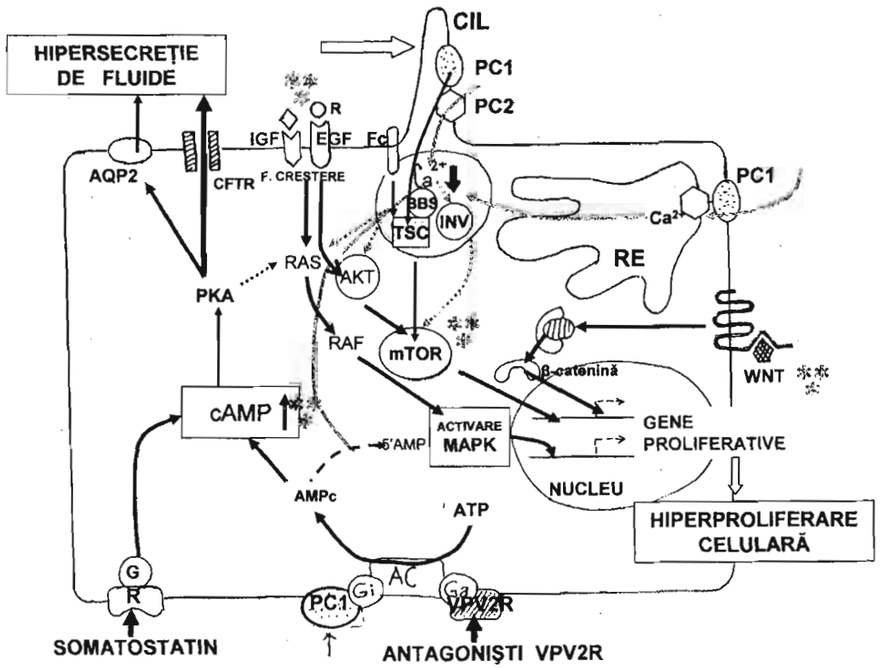
ADPKD este o boală ereditară dominantă, heterogenă, produsă de mutaţii în genele *PKD1* (cromozomul 16) - 85% din cazuri şi *PKD2* (cromozomul 4) - 15% din cazuri (1,3); mutaţiile celor două gene determină manifestări clinice similare, însă mai puţin severe la pacienţii cu mutaţii în *PKD2* (3). Gena *PKD1* codifică *policistina-1* (PC1), o proteină transmembranară - cu funcţii de receptor (ligand necunoscut), senzor ciliar, adeziune celulară - iar *PKD2* codifică *policistina 2* (PC2) - un canal de calciu; PC1 şi PC2 se asamblează şi acţionează împreună în mai multe procese de semnalizare (2,3). **ARPKD** este o afecţiune ereditară recesivă, determinată de mutaţii în gena *PKHD1*, ce codifică fibrocistina/poliductina (FC), o proteină transmembranară ce reglează expresia/funcţia PC2 (7,8). Nefronoftiziile (6 tipuri) sunt produse de mutaţii în genele *NPHP1-6*, ce codifică nefrocistinele (NC) 1-6, cu roluri multiple în funcţia ciliară, adeziunea celulară şi calea de semnalizare Wnt (3). Sindroamele cu chişti renali: Bardet-Biedl, Oro-facio-digital 1, scleroza tuberoasă, Meckel-Gruber ş.a. - sunt produse de mutaţii în diferite gene, care codifică proteine ce interacţionează cu PC1 sau FC, NC - formând un *releu funcţional comun*.

Deşi etiologic şi clinic ADPKD şi ARPKD sunt aparent boli diferite, patogenic ele sunt mult mai *asemănătoare* decât se credea anterior, deoarece genele care produc, prin mutaţie, aceste boli cooperează pentru a asigura morfologia normală a tubilor renali (9). Foarte recent s-a demonstrat că există o legătură directă între ADPKD şi NF, prin interacţiunea dintre proteinele mutante din aceste boli (10). A devenit astfel evident că *ADPKD, ARPKD şi NC sunt produse prin defecte diferite în acelaşi releu funcţional*, ce determină în final chiştii renali (2,8, 9,10)

IPOTEZA CILIARĂ

Multe din proteinele codificate de genele mutante în PKD - policistinele, fibrocistina, nefrocistinele ş.a. - sunt localizate (figura 1) în **cilul primar** (PC-1 şi PC-2 mai sunt situate şi la nivelul joncţiunilor celulă-celulă şi celulă-matrice; PC-2 se mai găseşte în reticulul endoplasmic şi fusul mitotic; defectele PC în aceste locaţii pot explica apariţia manifestărilor extrarenale ale PKD: chişti în ficat, splină, pancreas, tiroidă, vezicule seminale, anevrisme intracraniene, alte anomalii cardiovasculare, HTA prin activarea SAAR, endotelinei şi vasopresinei) al celulelor epiteliale ale tubilor renali (situat la polul apical, spre lumenul tubular) sau corpusculului său bazal /centrozom (corpusculul bazal formează polii fusului de diviziune în mitoză, conectând astfel ciliogeneza cu reglarea ciclului celular (13)) (2,3,11). Acest fapt sugerează că *disfuncţia ciliară poate fi o anomalie comună ce produce transformarea chistică* (12,13).

Date recente au demonstrat că *cilul primar funcţionează ca un mecanosensor şi chemosensor* (14). Fluxul intraluminal de fluide produce îndoirea cililor primari (imobili) şi *stimulează complexul PC1/PC2* („mecano-transductorul"), care *eliberează semnale* în citoplasmă (de ex. creşterea intracelulară a Ca^{2+}, activarea inversinei, blocarea beta-cateninei, represia CDK2); aceste semnale *activează sau reprimă mai multe căi*



PC1 - policistina 1; PC2 - policistina 2; Fc - fibrocistina; BBS - proteine din sindromul Bardet-Biedl; TSC - proteine (tuberina, hamartina) din scleroza tuberoasă; INV - inversina sau nefrocistina 2; EGF - factor de creştere epitelial; IGF - factor de creştere insulin-like; AQP2 - aquaporina 2; R - receptor cuplat cu proteina G; VPV2R - receptorul V2 a vasopresinei; RE - reticul endoplamic; PKA - protein-kinaza A; AKT - protein-kinaza B; AC - adenilciclaza; MAPK - *mitogen-activated protein kinase*; mTOR - *mammalian target of rapamicyn*; WNT - cale de semnalizare ce implică produsele morfogenelor Wg şi Int. *Activare

Fig. 1. Defecte în căile de semnalizare, mediate de cilul primar al celulelor epiteliale din tubii renali, ce produc chişti renali (prin hiperproliferare celulară şi hipersecreţie de fluide)

de semnalizare interconectate (implicând calciu intracelular, AMPc, proteinele-G, STAT 6 (STAT = signal transducers and activators of transcription), mTOR, Wnt) necesare pentru menţinerea structurii normale a nefronului; ele produc în *nucleu*: modificarea expresiei genice, reglarea ciclului celular, diferenţierea şi funcţia normală a epiteliului tubular sau repararea leziunilor renale (2,3, 15,16).

Defecte în formarea cililor, sinteza proteinelor ciliare (PC1/PC2, FC ş.a.) sau centrozomale (NC, tuberina şa.) sau perturbarea căilor de semnalizare spre nucleu - produc PKD, prin hiperproliferare celulară şi hipersecreţie de fluide (figura 1). Cu toate că mecanismele patogenice nu sunt complet elucidate este evident că toate **bolile chistice renale au o patogenie comună: defecte diferite în calea/releul de semnalizare mediat de cili** (8,9,13,15,16).

PATOGENIA FORMĂRII CHIŞTILOR

Studiile de genomică funcţională au demonstrat că mutaţiile genelor PKD produc: creşterea proliferării celulelor şi apoptozei, perturbarea migrării şi adeziunii celulare şi

alterarea polarităţii celulelor (localizarea apicală sau bazo-laterală a unor proteine) (2). Legătura dintre mutaţiile cauzatoare de boală şi activarea chistogenezei nu este încă complet elucidată (16) dar se ştie că prin aceste defecte se trece de la fenotipul normal al celulelor epiteliale ale tubilor renali (bine diferenţiat, nonproliferativ, polarizat, neabsorbant) la **fenotipul celular chistic** (de-diferenţiat parţial, hiper-proliferativ, cu defecte de polarizare şi adeziune, secretor şi capacitate de concentrare redusă). În felul acesta apar şi cresc progresiv chişti în toate segmentele tubilor renali şi canalelor colectoare (1,3,15,17).

Procesul de chistogeneză se desfăşoară în două faze: *iniţierea formării chiştilor şi expansiunea lor* (2,16).

1. Iniţierea formării chiştilor începe în perioada fetală şi continuă lent dar progresiv toată viaţa, fiind *determinată de mutaţiile genelor PKD*. Ele produc trei fenomene corelate: (a) creşterea proliferării celulare; (b) anomalii ale diferenţierii normale a celulelor epiteliale tubulare (de-diferenţiere); (c) anomalii a interacţiunilor celulă-celulă şi celulă-matrice (18).

a) Hiperproliferarea celulelor epiteliale tubulare este cel mai precoce fenomen ce duce la apariţia fenotipului chistic (fiind asociată cu creşterea apoptozei). Din acest punct de vedere, PKD în general şi ADPKD în special se aseamănă cu neoplaziile benigne; de aceea blocarea proliferării celulare este cea mai bună ţintă terapeutică în PKD (4,5,19,20,21).

Hiperproliferarea este generată de *activarea a trei căi majore de semnalizare* (figura 1) - calea Wnt / β catenină, calea mTOR (mTOR = *mammalian target of rapamyci* (kinază care stimulează proliferarea celulară)) şi calea Ras/MAPK (sau Ras/B-Raf/MEK/ERK) (MAPK sau MEK = *mitogen-activated protein kinase*. ERK = *extracellularly regulared kinase)* - care vor produce în nucleu hiper-expresia genelor proliferative *c-jun, c-fos, c-myc* şi *ciclina D*; la aceste căi de semnalizare se adaugă activarea CDK2/ciclina E (prin defecte în PC1) (în mod normal, PC1 inhibă activitatea CDK2 oprind celulele în faza G1/Go) (18,20,22).

(1). Activarea ectopică a căii Wnt (în mod normal represată), prin domeniul intracitoplasmatic al PC1, va duce la eliberarea de â-catenină care, după translocarea în nucleu, se cuplează cu factori de transcripţie şi stimulează genele proliferative (23,24) (figura 1). Căile de semnalizare Wnt au roluri esenţiale în dezvoltarea embrionară, (migrare şi proliferare celulară), diferenţiere (determinarea „destinului" celular), organizarea ţesuturilor şi arhitectura organelor, creştere renală şi regenerare celulelor adulte (reînoirea celulelor stem). Semnalizarea Wnt este esenţială pentru dezvoltarea renală (23);

(2). Activarea căii mTOR (în mod normal represată) este determinată de defecte în PC1 şi alte proteine chistice din cilul primar sau centrozomul său; ele stimulează *tuberina* (produsul genei *TSC2* ce determină scleroza tuberoasă) care, prin GTP-aza *Rheb*, activează kinaza mTOR producând creşterea proliferării celulare (figura 1). Activarea mTOR ar putea fi un punct de convergenţă a pierderii funcţiei ciliare prin mecanisme diferite (inclusiv prin factori de creştere) în multiple afecţiuni chistice (18, 25,26,27).

(3). Activarea căii Ras/MAPK (sau Ras/B-Raf/MEK/ERK) se poate face în bolile polichistice prin mai multe mecanisme interconectate (figura 2): (1) creşterea AMPc, secundară reducerii Ca^{2+} intracelular (prin defecte ale PC1/PC2), (2) sinteza crescută de a unor factori de creştere (EGF, IGF-1) şi receptorilor lor (EGF-R sau ErB2-R), exprimaţi anormal pe membrana apicală a celulelor epiteliale tubulare (18,19); (3) stimularea Akt (protein kinaza B) prin scăderea Ca^{2+} (produsă de alterarea PC1) (20).

Elucidarea acestor căi de semnalizare,

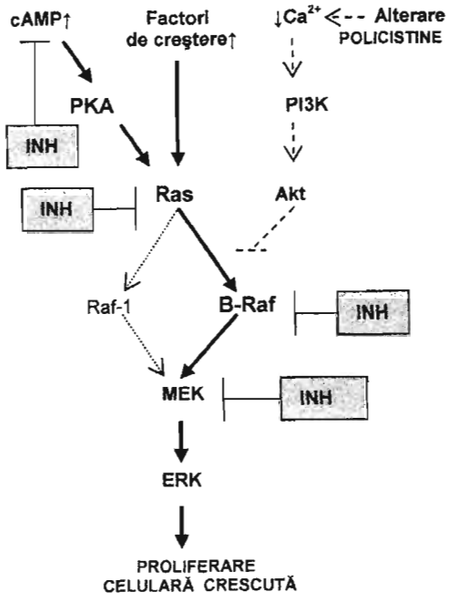


Fig. 2. Activarea căii proliferative Ras/B-Raf/MEK/ERK prin defecte ale policistinelor, creşterea nivelului AMPc sau expresia crescută a factorilor de creştere EGF şi IGF. „Ţintele terapeutice" ce pot produce inhibarea (INH) căii

care duc la creşterea proliferării celulelor epiteliale tubulare a permis identificarea unor *„ţinte terapeutice"* şi folosirea unor molecule ce le blochează proliferarea şi deci apariţia şi progresia chiştilor renali (21,28).

b) Anomaliile diferenţierii normale a celulelor epiteliale tubulare (dediferenţiere) se realizează prin:

(1) *alterarea polarităţii celulare* apical-bazolaterală - determină localizarea aberantă la polul apical (luminal) a unor proteine membranare (factori de creştere, receptori, transportori / canale ionice, enzime) (2,16,18);

(2) perturbarea „comunicării intercelulare" - ce determină „polaritatea celulară planară" (PCP), prin care diviziunile celulare au loc *paralel* cu axul antero-posterior al tubului renal şi determină alungirea lui (24,29); *alterarea polarităţii celulare planare"* (prin anomalii cale căii Wnt) în bolile chistice renale determină diviziuni celulare *aleatorii*, uneori perpendiculare pe axul tubului, producând *dilataţii chistice* (prin proliferare focală (24,29).

c) Anomalii în interacţiunile celulă-celulă şi celulă - matrice. Policistinele au şi alte localizări celulare, în afara cilului primar, la joncţiunile dintre celule sau dintre celule şi matricea extracelulară. Defectele acestor proteine determină, foarte probabil, manifestările extracelulare în special cele cardio-vasculare (1,2,16,18,19).

2. Expansiunea chiştilor renali este *independentă* de mutaţiile genelor PKD, se produce mai *tardiv* şi este *progresivă*. Există foarte probabil o cale comună pentru toate formele de PKD, care generează creşterea intracelulară a AMPc; acest fapt deschide „o fereastră" spre noi intervenţii terapeutice (27,28).

Expansiunea chiştilor este produsă de creşterea secreţiei intrachistice de fluide (figura 1) prin: (a) poziţionarea apicală (anormală) şi hiperexpresia CFTR (canalul clor), aquaporinelor şi pompei Na^+/K^+; (b) creşterea nivelului de AMPc (determinată de: reducerea intracelulară a Ca^{2+}; alterarea semnalizării receptorilor celulari cuplaţi cu proteina G pentru hormoni; (c) hipersecreţia de vasopresină, secundară defectelor de concentrare urinară, are un rol major în expansiunea chiştilor (pe calea receptorilor V2 care stimulează adenil-ciclaza şi creşte AMPc) (2,16,18,30,31).

Creşterea AMPc produce hipersecreţie de fluide, prin activarea canalului clor şi blocarea aquaporinelor. Scăderea nivelului intracelular a AMPc (inclusiv prin blocarea V2R sau scăderea secreţiei de vasopresină au devenit una din „ţintele terapeutice" majore în PKD (32).

Expansiunea chiştilor distruge parenchimul renal adiacent printr-un proces complex ce implică; trans-diferenţierea celu-

lelor epiteliale, depunere de colagen, modificări inflamamtorii şi reducerea vascularizaţiei (3,18,20).

VARIABILITATEA FENOTIPICĂ

Numeroase studii clinic au demonstrat o mare variabilitate fenotipică (de manifestare) inter- şi intra-familială (1,3,33) privind debutul, intensitatea, diversitatea manifestărilor clinice, severitatea PKD, manifestările extra-renale şi progresia spre IRCT. Elucidarea cauzelor genetice şi negenetice ale acestei mari variabilităţi fenotipice poate genera indicatori prognostici mai fideli.

Cauzele genetice ale variabilităţii fenotipice sunt reprezentate de: (a) *eterogenitatea genelor* implicate (mutaţiile genei PKD1 produce forme mai severe decât mutaţiile genei PKD2; (b) *poziţia mutaţiilor alelice* (în ADPKD: mutaţiile în regiunea 5' a genei determină forme severe; în ARPKD: mutaţii nonsens mai severe (cel puţin asupra fibrozei hepatice) ca cele missens; (c) *intervenţia genelor modificatoare:* ACE-I; CFTR; eNOS; TSC2 (33). În aceste condiţii **testele moleculare vor deveni cu siguranţă repere prognostice fidele** (34).

Cauzele negenetice sunt reprezentate de *factori hormonali* (evidenţi în ADPKD unde formele mai severe se întâlnesc la bărbaţi iar afectare hepatică este mai frecventă la femei şi creşte cu expunerile la estrogeni). Important este că variabilitatea fenotipică este generată şi de *factori de mediu*, ce pot fi controlaţi (cafeina creşte nivelul AMPc, fumatul are un rol nociv iar obezitatea, mai ales la bărbaţi, producc o progresie mai rapidă a bolii) (1,3,33).

PROGRESIA PKD SPRE IRCT

Cei mai mulţi dintre bolnavii cu PKD (de ex. 50-70% din cei cu ADPKD) evoluează inexorabil spre IRCT (2,3,15). IRCT se produce la 50-60 de ani, atunci când mărimea rinichilor este de cel puţin cinci ori mai mare decât normal (35). Dar, aceasta evoluţie nu este obligatorie, fiind condiţionată de intervenţia unor **factori de risc**: tipul de gene PKD, sexul, proteinuria şi prezenţa HTA; ei se corelează cu rata creşterii rinichilor în ADPKD (1). Problema esenţială este însă identificarea cauzelor ce determină progresia spre IRCT deoarece acestea ar putea fi **„ţinte terapeutice"**. Cercetările recente (5,15,19) au dus la identificarea unor posibile cauze: (a) distrugerea parenchimului renal prin *expansiunea chiştilor* ce induc apoptoza ţesutului sănătos; (b) creşterea *fibrozei interstiţiale* – cale comună tuturor nefropatiilor – prin transformarea celulelor interstiţiale în mioepiteliale şi depunerea de colagen; (c) modificări inflamatorii şi reducerea vascularizaţiei (3,19). Totuşi, dezvoltarea IRCT la circa 60% din pacienţii cu ADPKD rămâne neclară.

NOI MARKERI PENTRU APRECIEREA PROGRESIEI PKD

Identificarea *markerilor de progresie* este esenţială pentru a evalua evoluţia spre IRCT dar mai ales pentru determinarea corectă a efectelor potenţiale ale unei posibile terapii. Recent (35), studiul CRISP (*„Consortium of Radiologic Imaging Study*) a stabilit că măsurarea anuală (prin RMN seriate) a volumului renal, creşterii chiştilor şi fluxului sanguin renal – se corelează cu rata filtrării glomerulare şi severitatea bolii, detectând modificări semnificative ale progresiei bolii (13,15,35).

NOI ŢINTE TERAPEUTICE ÎN ADPKD

Bolile chistice renale erau considerate defecte ereditare *netratabile*. Descifrarea recentă a patogeniei moleculare a PKD a dus însă la **identificarea unor ţinte terapeutice**, în special în ADPKD. ADPKD este cea mai frecventă formă de PKD (1:800 persoane), care debutează morfopatologi perinatal, evoluează progresiv şi devine manifestă clinic la 30-40 de ani şi, de cele mai multe ori se termină cu IRCT (necesitând terapie de supleire sau transplant renal). În aceste condiţii orice tratament de stopare a apariţiei şi/sau evoluţiei chiştilor ar reprezenta un beneficiu enorm. Recent au fost validate pe modele animale şi introduse în testarea clinică noi terapii bazate pe inhibarea proliferării celulare (în special a căilor mTOR sau MAPK) a ampc intracelular şi a sistemului renină-angiotensină (4,5,15, 28,36).

1. Inhibarea proliferării celulare

Proliferarea celulară este evenimentul cel mai precoce în achiziţia fenotipului chistic. Înţelegând mai bine mecanismele care generează hiperproliferarea (fig. 1) s-au evaluat (mai întâi pe modele animale cu PKD şi apoi în trialuri clinice, aflate în diferite faze) mai multe terapii potenţiale, cu mare şansă de a deveni „operaţionale" (4,5,19, 20,21,22,28).

a) Inhibitori RAS şi RAF

În PKD – prin creşterea AMPc, activarea EGF, scăderea Ca^{2+} – se produce o activarea a căii Ras/B-Raf/MEK /ERK (care reglează expresia ciclinei D1), producând hiperproliferarea celulelor epiteliale (fig. 2). Terapia experimentală cu inhibitori de MEK pe modele animale cu PKD a produs blocarea chistogenezei (19,28,37,38).

b) Inhibitori EGF şi IGF sau blocanţi ai receptorilor EGF

Factorii de creştere (EGF şi IGF) sau receptorii lor sunt supraexprimaţi şi localizaţi anormal la polul apical al celulelor epiteliale; inhibiţia EGFR atenuează formarea chiştilor în modelele animale cu PKD (19,28,39,40).

c) Inhibitori ai căii mTOR

În celulele chistice se produce o activare a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) – o kinază care stimulează proliferarea celulară şi translaţia proteinelor. **Rapamicina** (sirolimus) (folosit în terapia imunosupresivă după transplant de organe) inhibă mTOR, scade proliferarea celulară (oprirea ciclului celular în G1) şi creşte apoptoza, producând blocarea progresiei chiştilor şi regresia mărimii rinichilor (4,25,26,41).

d) Inhibitori ai CDK2/ciclina E

În chistogeneză se produce precoce o dereglare a relaţiei dintre cili şi ciclul celular ce generează hiperproliferarea celulară. Roscovitina (Seliciclib) (un medicament anti-canceros cu administrare orală ce nu produce efectele adverse ale citostaticelor) – este un inhibitor selectiv a kinazelor dependente de ciclină (precum şi al căii Raf/MEK/ERK) şi al apoptozei. Experimentele efectuate pe modele animale cu PKD arată că roscovitina normalizează nivelul mai multor cicline, prevenind astfel proliferarea celulară, şi ameliorează progresia chiştilor prin inhibiţia trasncripţiei şi apoptozei (4,5,43,44). Roscovitina este un medicament anti-canceros cu administrare orală ce nu produce efectele adverse ale citostaticelor (!) şi are acţiune de lungă durată deşi se aplică o perioadă scurtă. Se pare că Roscovitina se impune în arsenalul terapeutic actual al PKD ca o terapie „ideală de primă linie " (43).

2. Inhibarea secreţiei

a) Reducerea nivelului AMPc – implicat atât în proliferare cât şi în secreţia de fluide (32) – prin: antagonişti ai receptorilor V2 ai vasopresinei; somatostatin; ingestia mai mare de apă.

(1) În ADPKD se produce o acumulare crescută de AMPc (prin scăderea Ca^{2+} sau sub acţiunea ADH), care prin canalul clor (dependent de AMPc) creşte secreţia de fluide. Antagoniştii receptorilor V2 (exprimaţi de celulele chistice) şi în special tolvaptanul (un medicament folosit deja în insuficienţa cardiacă congestivă, bine tolerat de pacienţi) scad AMPc şi produc o regresie spectaculoasă a chiştilor la animale cu PKD (30,32) şi la om (trialuri clinice faza II-B, III – efecte benefice, fără efecte adverse majore) (4,5).

(2) O abordarea alternativă pentru reducerea nivelului anormal al AMPc este folosirea somatostatinului care inhibă inhibă producerea de AMPc indusă de vasopresină şi permeabilitatea apei acţionând prin receptorii 1 şi 2 cuplaţi cu proteina G1 (5,45).

(3) Recent s-a demonstrat că prin ingestia mai mare de apă se reduce nivelul vasopresinei plasmatice (prin scăderea expresiei V2R) şi se încetineşte progresia bolii la şobolanii cu PKD (31,47). Această abordare terapeutică validată prin cercetări foarte recente (31) pare surprinzătoare deoarece apa este „remediul" unor boli ereditare care umplu rinichii cu ... apă.

3. Restaurarea eliberării intracelulare de Ca^{2+}

Defectele în PC2 (canal de calciu) sau PC1 (proteina sa reglatoare) diminuă nivelul intracelular al Ca2+ şi activează diferite căi de semnalizare ce produc chişti renali prin hiper-proliferarea celulelor epiteliale tubulare şi hiper-secreţie de fluide. Recent s-a demonstrat că triptolidul, un diterpen activ biologic, produs natural (izolat dintr-o viţă de vie medicinală *Tripterygium wilfordii*), folosit (ca citostatic, antiinflamator etc.) în medicina tradiţională din China, induce eliberarea de Ca^{2+} printr-un mecanism dependent de PC2, opreşte creşterea celulară şi reduce progresia chiştilor (pe modele animale cu PKD) (48).

CONCLUZII

Cu toate progresele extraordinare din ultimii cinci ani în descifrarea patogeniei moleculare a PKD, mai există încă probleme neclare privind progresia chiştilor şi progresia insuficienţei renale.

Au apărut însă terapii cu efecte potenţiale benefice care inhibă proliferarea celulară şi hipersecreţia, blocând apariţia şi progresia chiştilor. Experimentate pe modele animale cu PKD ele se află în diferite faze a trialurilor clinice. Cercetările viitoare vor trebui să determine cele mai eficiente tratamente în PKD (dozaj, moment de începere etc.), care vor include probabil mai multe clase de medicamente, combinate sau alternative.

În terapia PKD se vede deja o „luminiţă la capătul tunelului" (28) dar mai este de parcurs ... tunelul. Anii următori vor fi „excitanţi" atât pentru pacienţii cu PKD cât şi pentru medici. Cert este că în acest domeniu de patologie, veritabilă problemă de sănătate publică, medicina actuală a demonstrat că ... este moleculară şi eficace.

BIBLIOGRAFIE

1. Covic M, Covic A. *Boala polichistică renală autosomal dominantă (ADPKD)*. Iaşi: Ed. Polirom, 1999.
2. Torres VE, Harris PC. Mechanisms of disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 40-55.
3. Wilson DP. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2004; 350: 151-164.
4. Ibraghimov-Beskrovnaya O. Molecular pathogenesis of ADPKD and development of targeted therapeutic options. *Nephrol Dial Tansplant* 2007; 22: 3367-3370.
5. Chapman AB. Autosomal dominant polycystic kidney disease: time for a change? *J Am Soc Nehprol* 2007; 18: 1399-1407.
6. Scolari F, Caridi G, Rampoldi L et al. Uromodulin storage diseases: clinical aspects and mechanisms. *Am J Kid Dis* 2004; 44: 987-999.
7. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 2002; 30: 259-269.
8. Kim I, Fu I, Hui K et al. Fibrocystin/Polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 455-468.

9. Kaimori J, Germino GG. ARPKD and ADPKD: first cousins or more distant relatives. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 416-418.
10. Cai Y, Somlo S. Too much of a good thing: does Nek8 link polycystic kidney disease and nephronophtisis. *Am Soc Nephrol* 2008; 19: 418-420.
11. Pan J, Wang Q, Snell WJ. Cilium-generated signalling and cilia-related disorders. *Lab Invest* 2005; 85: 452-463.
12. Pazour GJ. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2528-2536.
13. Yoder BK. Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1381-1388.
14. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y et al. Polycystins 1 and 2 mediate mecanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 2003; 33: 129-13.
15. Igarashi P, Somlo S. Polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1371-1373.
16. Calvet JP, Grantham JJ. The genetics and physiology of polycystic kidney disease. *Semin Nephrol* 2001; 21: 107-123.
17. Smith LA, Bukanov NO, Husson H et al. Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormality and common features with human disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2821-2831.
18. Ong ACM, Harris PC. Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex get complex. *Kidney Int* 2005; 67: 1234-1247.
19. Simons M, Walz G. Polycystic kidney disease: cell division without a c(l)ue ? *Kidney Int* 2006; 70: 854-864.
20. Nelson PJ, Shamki SJ. Therapeutics in renal disease: the road ahead for antiproliferative targets. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 103: e6-e15.
21. Bello-Reuss E. Inhibition of tubule-cell proliferation to prevent cyst formation: a new avenue to treat ADPKD? *Kidney Int* 2007; 72: 135-137.
22. Weimbs T. Polycystic kidney disease and renal injury repair: common pathways, fluid flow and the function of polycystin-1. *Am J Physiol Renal Physyol* 2007; 293: F1423-F1432.
23. Benzing T, Simons M, Walz G. Wnt signalling in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1389-1398.
24. Simons M, Gloy J, Ganner A et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, function as a molecular switch between Wnt signalling pathways. *Nat Genetic* 2005; 37: 537-543.
25. Mostov KE. mTOR is out of control in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5247-5248.
26. Shillingford JM, Murcia NS, Larson CH et al. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1 and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 5466-5471.
27. Bukanov NO, Smith LA, Klinger KW, Ledbetter SR, Ibraghimov-Beskrovnaya O. Long lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine. *Nature* 2006; 444: 949-952.
28. Walz G. Therapeutic approaches in autosomal polycystic kidney disease (ADPKD) is there a light at the end of the tunnel? *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 1752-1757.
29. Fischer E, Legue E, Doyen A et al. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genetic* 2005; 38: 21-23.
30. Gattone VH, Maser RL, Tian C, Rosenberg JM, Branden MG. Developmental expression of urine concentration-associated genes and their altered expression in murine infantile type polycystic kidney disease. *Dev Genet* 1999; 24: 309-318.
31. Wang W, Wu Y, Ward CJ, Harris PC, Torres VE. Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 102-108.
32. Torres VE. Cyclic AMP at the hub of the cystic disease, *Kidney Int* 2004; 66: 1283-1285.
33. Rossetti S, Harris PC. Genotype-phenotype correlation in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1374-1380.

34. Rossetti S, Consugar MB, Chapmann AB et al. Comprehensive molecular diagnostics in autosomal polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 17: 2143-2160.
35. Grantham JJ, Torres VE, Chapman AB et al. Volume progression in polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 354: 2122-2130.
36. Calvet JP. MEK Inhibition holds promise for polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1498-1500.
37. Yamaguchi T, Nagao S, Wallace et al. Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal. *Kidney Int* 2003; 63: 1983-1994.
38. Omori S, Hida M, Fujita H et al. Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1604-1614.
39. Torres VE, Sweeney WE, Wang X et al. EGF receptor tyrosine kinase inhibition attenuates the development of PKD in Han: SPRD rats. *Kidney Int* 2003; 64: 1573-1579.
40. Parker E, Newby LJ, Sharpe CC et al. Hyperproliferation of PKD1 cystic cells is induced by insuline-like growth factor activation of Ras/Raf signaling system. *Kidney Int* 2007; 72: 157-165.
41. Qian Q, Du H, Kumar S et al. Sirolimus reduces polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 631-638.
42. Tao Y, Kim J, Faubel S et al. Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slow progression in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3954-6959.
43. Kuehn W, Walz G. Prime time for polycystic kidney disease: does one shot o roscovitine bring the cure? *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22: 2133-2135.
44. Ibraghimov-Beskrovnaya O. Targeting dysregulated cell cycle and apoptosis for polycystic kidney disease. *Cell Cycle* 2007; 6: 776-779.
45. Ruggenenti P, Remuzzi A, Ondei P et al. Safety and efficacy of long acting somatostatin treatment in autosomal polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 206-216
46. Nagao S, Nishii K, Katsuyama M et al. Increased water intake decreases progression of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2220-2227.
47. Grantham JJ. Therapy for polycystic kidney disease? It's water, stupid. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1-7.
48. Leuenroth SJ, Okuhara D, Shotwell JD et al. Triptolide is a traditional Chinese medicine-derivated inhibitor of polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 4389-4394.

NOUTĂŢI

VACCINURI HPV ŞI PREVENIREA CANCERULUI CERVICAL

Cancerul cervical este al doilea tip de cancer ce provoacă moartea printre femeile din lumea întreagă. Unic printre cancerele umane, el este atribuit în întregime infecţiei. Cancerul cervical este provocat de infectarea profundă a epiteliului anogenital cu un virus uman papilomavirus (HPV) aparţinând unei subcategorii limitate. Mai multe încercări recente au arătat că vaccinurile profilactice, bazate pe particule de virus papilomavirus (PV) produse folosind tehnologia ADN-ului recombinant, asigură imunitatea pe termen lung împotriva infecţiei cu genotipuri PV încorporate şi împotriva condiţiilor premaligne cauzate de aceste infecţii. Distribuirea eficientă a acestor vaccinuri, care au eficacitate şi siguranţă foarte bună, ar putea să reducă cu un procent de 70% îmbolnăvirea cu cancer cervical, infectarea cu boli pre-cancerigene şi prevenirea apariţiei chisturilor genitale la tinerile femei, prin imunizarea universală. Vaccinurile în prevenirea infecţiei cu HPV vor avea o mare importanţă în efortul global pentru prevenirea cancerului cervical. Distribuirea vaccinurilor HPV în întreaga lume, care necesită noi resurse de capital şi noi strategii de livrare, va crea o mai bună speranţă în prevenirea cancerului cervical şi a altor tipuri de cancer asociate cu HPV (Frazer IH. HPV vaccines and the prevention of cervical cancer. *Update Cancer Therap* 2008; 3: 43-48).

Simona Gherman

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2007 - vol. 111, nr. 4

CALCIFICĂRILE VASCULARE MEDIALE LA PACIENŢII CU DIABET ZAHARAT TIP 2

Maria Isabela Belovici, G.I. Pandele
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Clinica a VI-a Medicală

MEDIAL ARTERIAL CALCIFICATION IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS PATIENTS (Abstract): Arterial calcification was previously viewed as an inevitable, passive, and degenerative process that occurred at the end stages of atherosclerosis. Recent studies, however, have demonstrated that calcification of arteries is a complex and regulated process. It may occur in conjunction with atherosclerosis or in an isolated form that is commonly associated with diabetes and renal failure. Higher artery calcium scores are associated with increased cardiovascular events, and some aspects of arterial calcification are similar to the biology of forming bone. Arterial calcification can thus be viewed as a distinct inflammatory arteriopathy, much like atherosclerosis and aneurysms, with its own contribution to cardiovascular morbidity and mortality. Current research involves efforts to define the complex interactions between cellular and molecular mediators of arterial calcification and, in particular, the role of endogenous calcification inhibitors. This review discusses the clinical relevance, cellular events, and suspected molecular pathways that control arterial calcification. **Key words**: ARTERIAL CALCIFICATION, DIABETES, ENDOGENOUS CALCIFICATION INHIBITORS

De aproape două secole cercetătorii au arătat că procesul de calcificare este o parte componentă a bolii vasculare arteriale (1). Virchow a fost primul care a asociat afectării arteriale denumirea de *arteritis deformans* şi ateroscleroză, subliniind faptul că pe specimenele vasculare studiate a evidenţiat zone de calcificare similare ţesutului osos, ele fiind o consecinţă a statusului inflamator de la nivel arterial (2).

În 1983, utilizând microscopia electronică cuplată cu metode histochimice, Anderson et al. au demonstrat că veziculele matriceale care conţin fosfatază alcalină sunt implicate în procesul de calcificare medială, dar şi în ateroscleroză, dovedind astfel cu probe ultrastructurale teoria lui Virchow ce susţinea că procesul de calcificare vasculară este un proces osteogenic (3). Ulterior, Demer et al. au evidenţiat, pentru prima dată, implicarea în biologia calcificărilor vasculare a unor elemente moleculare caracteristice osteogenezei ectopice (4).

În 2007, Ajkawa a implementat o nouă tehnică de vizualizare la nivel molecular prin cuplarea microscopiei în fluorescenţă cu rezonanţa magnetică nucleară; această tehnică a permis elucidarea unor mecanisme care intervin precoce în metabolismul matricei aortice în cadrul procesului de calcificare arterială (5). Aceste câteva date susţin importanţa acordată în ultimul timp calcificărilor arteriale.

Există patru tipuri diferite de calcificări cardiovasculare: intimale de tip aterosclerotic, la nivel de tunică medie (mediocalcinoza), calcificarea valvelor cardiace şi calcifilaxia (1,6). Aceste patru tipuri de

calcificare sunt consecinţa intervenţiei unor mecanisme complexe, specifice fiecărui tip de calcificare, dar în parte superpozabile. De asemenea, s-a demonstrat că miocardul poate dezvolta, similar muşchiului scheletic, leziuni de tip *miositis ossificans,* ca şi consecinţă a unei leziuni tisulare.

Studii repetate au demonstrat că mediocalcinoza este mult mai frecventă la pacienţii vârstnici, diabetici sau cu insuficienţă renală cronică în comparaţie cu populaţia generală (7).

Deşi diabetul zaharat este cauza majoră a insuficienţei renale cronice, studiile au demonstrat că hiperglicemia cronică şi perturbările metabolice caracteristice diabetului reprezintă factori de risc independenţi pentru riscul de apariţie a calcificărilor vasculare (8). Datorită asocierii multiplilor factori de risc vascular, boala diabetică induce o prevalenţă crescută a bolii aterosclerotice, a calcificărilor arteriale şi a mortalităţii cardiovasculare. De asemenea, glicemia a jèun este corelată cu scorul calciului aortic, nu însă şi cu cel coronar (9).

Pacienţii diabetici prezintă frecvent atât calcificări mediale (mediocalcinoza Mőnckeberg), cât şi intimale aterosclerotice, acestea având o contribuţie sinergică în apariţia bolii vasculare şi a efectelor clinice ale acesteia (9,10,11). Mediocalcinoza este un indicator al severităţii şi duratei diabetului zaharat, fiind strâns corelată cu o serie de complicaţii ale bolii, în special cu neuropatia diabetică, dar şi cu nefropatia diabetică.

Mediocalcinoza reprezintă, de asemenea, şi un important factor predictiv pentru riscul de morbiditate şi mortalitate cardiovasculară, dar şi pentru riscul de amputaţie de membru inferior la pacienţii diabetici cu afectare arterială periferică (12,13). Amplificarea semnificativă a riscului de amputaţie şi a mortalităţii cardiovasculare se datorează disfuncţiei de tip diastolic generată de scăderea complianţei arterelor elastice. În cursul sistolei, potenţialul energetic este stocat în arterele elastice de calibru mare. Energia cinetică (cunoscută sub denumirea de funcţie Windkessel) este ulterior eliberată în cursul fazei de relaxare a ciclului cardiac, asigurând astfel perfuzia miocardică diastolică şi perfuzia patului vascular distal. Rigidizarea arterială determinată de procesul de calcificare determină o presiune de puls crescută şi o cinetică înalt pulsatilă a fluxului sangvin; la acestea se asociază o creştere a presiunii sistolice şi o creştere a consumului miocardic de oxigen. Consecinţa o reprezintă creşterea travaliului cardiac şi scăderea perfuziei tisulare periferice. Compromiterea funcţiei Windkessel a arterelor elastice are o contribuţie majoră în amplificarea riscului de amputaţie de membru inferior la pacienţii cu diabet zaharat tip 2 (14).

Până recent, calcificările arteriale au fost considerate ca fiind rezultanta unui proces pasiv asociat aterogenezei sau vârstei înaintate şi având ca substrat un răspuns la leziunea sau necroza vasculară. Mai nou, s-a demonstrat că *procesul de calcificare este de fapt un proces activ, reglat de factori multipli.*

Procesul de calcificare vasculară se bazează pe două mecanisme majore: primul este reprezentat de inducerea osteogenezei de către factori endocrini, inflamatori, mecanici, metabolici sau morfogenetici, iar al doilea de perturbarea mecanismelor de inhibare a mineralizării. Dezechilibrul dintre factorii protectivi şi cei care induc apariţia calcificărilor este caracteristic diabetului zaharat, insuficienţei renale cronice (13), ateromatozei şi vârstei înaintate (tab. I).

Procesul de calcificare vasculară este similar formării osoase ortotopice; *mineralizarea se realizează la nivel intimal printr-un proces similar osificării endocondrale, iar la nivel de media printr-un proces similar osificării intramembranoase* (15,16).

Procesul de calcificare medială prezintă particularităţi în cazul pacienţilor cu diabet

TABELUL I

Dezechilibrul dintre factorii promotori şi cei inhibitori ai procesului de calcificare vasculară este caracteristic diabetului zaharat

FACTORI PROMOTORI AI CALCIFICĂRILOR VASCULARE	FACTORI INHIBITORI AI CALCIFICĂRILOR VASCULARE
• statusul inflamator (fibrinogen, hsCRP, IL1, IL6, TNFα) • stresul oxidativ (ROS) • stresul reductiv • stresul hemodinamic (shear stress, hipertensiunea sistolică) • hiperglicemia, AGE • insulina (în condiţii de insulinorezistenţă) • dislipidemia, ALE, LDLox • sistemul renină angiotensină-aldosteron (renal, vascular, intracelular) • hiperfosfatemia (Pi), Pit-1, hipercalcemia • creşterea produsului Ca x P • fosfataza alcalină • fragmente de PTH • PTH via PTHR2 (?) • vitamina D (deficit/exces) • vitamina K (deficit) • elastinoliza • apoptoza, growth arrest-specific gene 6 (Gas6) • BMP-2, Msx2, Wnt, Cbfa1, Osterix, Sox9 • Adipokine (Leptina) • IGF-1, TGF-β • Chlamydia pneumoniae • Warfarina • Nicotina • Estradiol (via TNF-α şi TGF-β)	• MGP (matrix carboxyglutamic acid Gla protein) • OPN (osteopontina) • Fetuina-a • β-glucozidaza • Desmina, Decorina • Smad 6 • BMP7 • Anhidraza carbonică II • OPG (osteoprotegerina) • Ppi (pirofosfatul anorganic) • Pit-1 • PTH (1-84) şi PTH (1-34) via PTH1R • HDL-colesterol • Insulina (în condiţii fiziologice– glicemie şi sensibilitate la insulină normale) • Estradiol (via OPG şi MGP) • Factori farmacologici: bifosfonate, statine, chelatori de fosfat (Sevelamer), blocanţi ai canalelor de calciu (nifedipina, amlodipina), agenţi calcimimetici (AM-073), antagonişti de receptori mineralo-corticoizi (spironolactona, eplerenona), antagonişti de receptori endotelinici

zaharat. La diabeticii cu mediocalcinoză nucleele de mineralizare sunt reprezentate de vezicule matriceale (17), depunerile de fosfat de calciu la nivel de media apar şi în absenţa leziunilor intimale de tip placă de aterom, sau a neointimei, iar caracterul calcificărilor mediale este concentric, spre deosebire de calcificările intimale care au caracter excentric (6,15).

Până în prezent au fost identificate două tipuri de vezicule lipidice care reprezintă nuclee de mineralizare în procesul de calcificare arterială:

1. corpii apoptotici (cu diametru de 250 nm) derivaţi din celule neviabile;

2. veziculele matriceale mineralizante (100 nm diametru) care sunt eliberate printr-un *proces activ* de la nivelul celulelor musculare netede vasculare (CMNV) şi al celulelor vasculare calcifiante (CVC) (17).

Corpii apoptotici rezultaţi din celulele spumoase neviabile şi din fragmente reziduale de CMNV, împreună cu veziculele matriceale derivate din CMNV şi CVC viabile constituie microzone la nivelul cărora se realizează o concentraţie crescută de calciu şi fosfat, reprezentând astfel un micromediu propice pentru fenomenul de nucleaţie (17,18,19).

Studii repetate au încercat să elucideze mecanismele moleculare implicate în reglarea procesului de calcificare arterială, în inducerea osteogenezei. În 1998, Towler et al. au demonstrat că dieta bogată în grăsimi induce la şoarecii cu deficit de receptori LDL obezitate, insulinorezistenţă şi diabet

zaharat, dislipidemie şi calcificări vasculare (6,20). Aceste modele animale de diabet zaharat tip 2 prezinta o activare a cascadei osteogenice BMP2-Msx2. Expresia genică dependenta de Msx2 este esenţială în osificarea membranoasă craniofacială (21).

Coroborarea acestor date a condus la ipoteza conform căreia mediocalcinoza diabetică implică mecanisme genice similare osificării craniofaciale. Ulterior s-a demonstrat că activarea BMP2-Msx2 se realizează într-un subset de miofibroblaşti doar la nivelul adventicei arteriale sau interstiţiului valvular aortic, dar nu şi la nivelul mediei (22).

Diabetul zaharat este responsabil de generarea prin mecanisme complexe a unui status inflamator şi a stresului oxidativ la nivelul peretelui vascular. Acestea determină activarea unei cascade de semnale osteogenice prin intermediul proteinei osoase morfogenetice BMP2 corelată cu factorul de transcripţie Msx2 (20). Hiperglicemia cronică amplifică producerea de BMP2 în pericitele şi miofibroblaştii mezangiali (20, 23). Speciile reactive de oxigen, citokinele inflamatorii (TNF-α) şi stresul de forfecare amplifică expresia/sinteza de BMP2 şi BMP4 la nivelul celulelor endoteliale (24,25).

Hiperglicemia cronică şi dislipidemia determină *activarea diferenţierii adipogenice a pericitelor adventiceale*. Statusul inflamator generat la nivel parietal de perturbările metabolice din cadrul diabetului determină proliferarea adipocitelor adventiceale. În calitate de organ endocrin, ţesutul adipos produce TNF-α, interleukina 6 (IL6), vascular endothelial growth factor (VEGF) şi alte adipokine. Consecinţa acestor procese este reprezentată de generarea unui status inflamator-oxidativ la nivel de adventice, creşterea sintezei de BMP2, apariţia *neoangiogenezei* şi apariţia infiltrării monocitare la nivelul peretelui vascular. Semnalele osteogenice vasculare iniţiate prin acţiunea BMP2-Msx2 la nivel de adventice sunt transmise în manieră concentric-centripetă către tunica medie prin intermediul vaselor de neoangiogeneză derivate din vasa vasorum; ele realizează un flux sangvin parietal al cărui vector este îndreptat dinspre adventice către tunica medie (22,26).

În paralel cu angiogeneza adventiceală se înregistrează şi o expansiune a populaţiei de celule mezenchimale multipotente, cu dezvoltarea unui subset de celule ce prezintă o expresie amplificată a factorului de transcripţie osteogenic Msx2 la acţiunea BMP (27). Msx2 exercită un efect adipostatic, prevenind diferenţierea adipogenică a miofibroblaştilor şi pericitelor adventiceale, stimulând însă diferenţierea lor osteogenică pe calea semnalelor mediate de osterix (27,28,29).

Pe de altă parte, Msx2, ca factor de transcripţie, este responsabil de generarea unui mediu pro-osteogenic la nivel adventiceal prin amplificarea expresiei liganzilor de tip Wingless (Wnt) - Wnt3a şi Wnt7a. Factorii Wnt sunt polipeptide care se leagă specific de proteinele asociate receptorilor LDL (LDLR-related protein – LRP), activând cascada de semnale mediate de LRP5 şi LRP6; consecinţa este reprezentată de expresia genelor osteogenezei prin transcripţie dependentă de β-catenina nucleară (30,31). Activitatea pro-osteogenică şi adipostatică a Msx2 este inhibată de către factorul Dickkopf (Dkk1), un ligand inhibitor al Wnt. Studiile *in vitro* au demonstrat ca Msx2 suprimă expresia Dkk1 la nivelul celulelor mezenchimale, amplificând concomitent expresia genică a Wnt.

Fluxul microvascular parietal concentric care irigă media prin vasele de neoformaţie provenite de la nivelul adventicei reprezintă calea pe care semnalele paracrine ale Wnt ajung la nivel de tunica medie (22), dar şi calea pe care sunt recrutate celule de tip osteoblast-like de la nivel adventiceal.

La nivel de media arteriala Wnt amplifică activitatea fosfatazei alcaline şi producerea de vezicule matriceale (7,28). Fosfataza alcalină determină scăderea nivelului de pirofosfat anorganic, care este un important inhibitor al mineralizării; se creează astfel condiţii ce favorizează calcificarea vasculară (32,33). Mediocalcinoza diabetică poate fi considerată deci o ,,Wntopatie'' responsabilă de amplificarea activităţii fosfatazei alcaline la nivel de media şi de calcificarea vasculara mediată de vezicule matriceale.

Depunerea de fosfat de calciu se realizează circumferenţial la nivel de media şi este mediată de vezicule matriceale ca în osificarea ortotopică membranoasă (15,34).

Calcificarea concentrică medială din cadrul diabetului se datorează relaţiei mediate de fluxul microvascular parietal dintre două categorii de celule:

1. celulele adventiceale stimulate de BMP2; ele exprimă Msx2 şi sintetizează ulterior Wnt (22);

2. celulele vasculare calcifiante mediale (9,28,35).

Celulele calcifiante vasculare (CVC) reprezintă un subtip de miofibroblaste macrovasculare şi sunt similare pericitelor de la nivel microvascular (35). Ele derivă fie dintr-o subpopulaţie de celule musculare netede parietale (CMNV), fie din progenitori mezenchimali multipotenţi adventiceali activaţi, care au căpătat un profil osteogenic. Morfogenele scheletale de tipul BMP-2 (bone morphogenetic protein-2), Wnts si BMP-4 determină virarea CMNV şi a acestor precursori către un profil osteogenic.

În procesul de transformare fenotipică, CMNV îşi pierd profilul contractil, virând către un fenotip secretor. În acelaşi timp, modularea fenotipică se asociază cu pierderea expresiei markerilor reprezentativi pentru fenotipul contractil (desmina, SMα-actina, SM22α, SM-MHC); concomitent, celulele modificate fenotipic iniţiaza şi amplifica progresiv expresia markerilor tipici fenotipului secretor – osteopontina OPN, fosfataza alcalină, osteocalcina, Cbfa-1/Runx2. Întregul proces culminează cu depunerea de matrice extracelulară de către celulele osteoblast-like.

FACTORI PROMOTORI AI PROCESULUI DE CALCIFICARE ARTERIALĂ

- **Leptina**

Studii efectuate în ultimii ani au demonstrat că în apariţia calcificărilor vasculare ar putea fi implicată şi o creştere a nivelului de leptină. Creşterea nivelului seric de leptină se asociază cu obezitatea (în special cea abdominală) şi cu insuficienţa renală, care determina o reducere a filtrarii leptinei. Riscul de hiperleptinemie creşte la pacienţii cu diabet zaharat de tip 2, boala care asociază frecvent obezitatea abdominală şi un grad de afectare renală consecutiv nefropatiei diabetice. Leptina este implicata în apariţia calcificărilor arteriale prin efectele pe care le determina activarea receptorilor specifici la nivel central şi periferic.

Efecte centrale ale leptinei

Leptina determină o creştere a tensiunii arteriale prin mecanism central la nivel hipotalamic. Acest mecanism presupune activarea sistemului nervos simpatic, ce determină creşterea rezistenţei vasculare periferice şi amplificarea absorbţiei renale tubulare de sodiu. Studiile efectuate pe animale obeze şi diabetice, care prezentau o rezistenţă la efectul anorexigen şi de reducere a greutaţii corporale exercitat de leptină, au demonstrat că aceste animale îşi conservă activarea simpatică renală indusă de leptina. Aceste date au condus la ipoteza existenţei unei *rezistenţe selective la leptina la nivel central hipotalamic la subiecţii obezi şi diabetici.* Rezistenţa pare să se limiteze la nucleul arcuat (responsabil de scăderea în greutate), în timp ce sensibilitatea la leptina la nivelul nucleilor hipotalamici ventromedial şi dorsomedial (care reglează activitatea simpatică renală şi tensiunea arterială) rămâne intactă. Rezistenţa selectivă la leptină

s-ar putea datora şi existenţei unor căi divergente de transmitere a semnalelor la nivel post-receptor (36,37,38).

Efecte periferice ale leptinei

Iniţial s-a considerat ca receptorii leptinici sunt prezenţi doar la nivel central hipotalamic, ulterior fiind identificaţi însa şi la nivel periferic. Receptorul leptinic Ob-Rb este exprimat în majoritatea ţesuturilor implicate în reglarea metabolismului glucidic şi al acizilor graşi (insulele pancreatice, ţesut adipos, ţesut muscular şi ficat).

Leptina stimulează oxidarea acizilor graşi în ţesuturile metabolic active. În adipocite, leptina diminuă prin mecanism direct lipogeneza, creşte expresia enzimelor implicate în oxidarea acizilor graşi şi stimulează o nouă formă de lipoliză în care glicerolul este eliberat fără a exista o eliberare proporţională de acizi graşi. Leptina inhibă, de asemenea, lipogeneza şi stimulează oxidarea acizilor graşi la nivelul ficatului şi în ţesutul muscular. Leptina este astfel implicată în circumstanţe patologice (obezitate, diabet zaharat tip 2) în generarea stresului oxidativ, care constituie un stimul pentru apariţia calcificărilor arteriale.

Leptina sintetizată la nivelul ţesutului adventiceal perivascular este implicată în apariţia disfuncţiei endoteliale, ea acţionând pe *receptorii leptinici situaţi la nivelul celulelor musculare netede, trombocitelor şi celulelor inflamatorii* (39).

Hiperleptinemia influenţează dilatarea arterială dependentă de endoteliu; nivelele de leptină prezintă o corelaţie negativă cu nivelul de oxid nitric (NO). *In vitro* leptina amplifică şi producţia de endotelină-1. Aceste mecanisme susţin implicarea leptinei în creşterea tonusului vascular, etapa premergătoare apariţiei calcificărilor arteriale (40).

Leptina activează receptorii β-adrenergici de la nivelul osteoblastelor. Studiile efectuate pe animale au demonstat că există o corelaţie inversă între modularea nivelelor de leptină şi masa osoasă, creşterea nivelelor de leptină determinând o scădere a masei osoase.

Rolul leptinei în influenţarea calcificărilor ortotopice nu este pe deplin elucidat. Există studii *in vitro* care au demonstrat că leptina mediază calcificările vasculare. Astfel, se pare că leptina stimulează diferenţierea celulelor stem de la nivel medular într-un fenotip osteoprogenitor identificat după nivelul de activitate a fosfatazei alcaline şi nivelul proteinelor specifice. De asemenea, leptina poate induce *in vitro* diferenţierea osteoblastică şi calcificarea CVC, poate acţiona selectiv pe anumite celule musculare netede vasculare, în special pe acelea care manifestă o predispoziţie pentru transformarea osteoblastică; receptorii leptinei sunt exprimaţi la nivelul CVC şi la nivelul unor subpopulaţii celulare prezente în peretele arterial la şoareci.

De asemenea, s-a demonstrat că leptina poate determina o creştere a stresului oxidativ în celulele endoteliale aortice, stresul oxidativ determinând o creştere a producerii de BMP2 în aceste celule.

- **Hiperglicemia – Hiperinsulinemia**

Diabetul zaharat de tip 2 se caracterizează prin asocierea dintre hiperglicemie şi hiperinsulinemie în etapele premergătoare şi cele iniţiale ale afecţiunii, etape ce presupun un status de insulinorezistenţă. Ulterior, în evoluţia bolii survine epuizarea celulelor beta; în consecinţă, statusului de insulinorezistenţă i se asociază deficitul insulinic.

Chen et al. au demonstrat că hiperglicemia determină o amplificare a expresiei Cbfa1, fosfatazei alcaline şi osteocalcinei în celulele musculare netede bovine; aceste efecte se acompaniază şi de o amplificare a depunerilor de calciu (41). Conversia fenotipică osteogenică a celulelor musculare netede (CMNV) este dependentă de protein kinaza C (PKC) şi se datorează parţial creşterii producerii de BMP-2.

Olesen et al. au demonstrat recent că

hiperinsulinemia accelerează depunerea de calciu la nivelul CMNV şi se asociază cu o scădere a sintezei de osteoprotegerină (OPG) (42). După legarea de receptorul specific, insulina activează o cascadă de semnale intracelulare, procesul fiind mediat de către substratul receptorului insulinic (IRSs); acesta la rândul său se leagă de o serie de proteine efectoare, dintre care şi PI3K (fosfoinozitid 3-kinaza) care activează recrutarea la nivelul membranei celulare a transporterilor de glucoză, stimulând astfel aportul intracelular de glucoză. Această cale de transmitere a semnalelor insulinice la nivel intracelular este numită ,,good pathway'', calea responsabilă de aportul glucozei intracelular.

Prin intermediul IRSs, insulina poate stimula şi MAPKs (mitogen-activated protein kinases). Consecinţa o reprezintă activarea unor mecanisme proaterogenice (migrarea şi proliferarea CMNV) şi amplificarea expresiei unor factori protrombotici, profibrotici şi de adeziune (43). Studiile au demonstrat că statusul de insulinorezistenţă se asociază cu o inhibare selectivă a căii PI3K (44). Creşterea subsecventă a nivelului de insulină forţează calea proaterogenă mediată de MAPKs (,,bad pathway'').

Diabetul de tip 2 este un important factor de risc pentru afecţiunile cardiovasculare, în timp ce insulinorezistenţa *per se* amplifică rata de apariţie a evenimentelor cardiovasculare (45). Wang et al. au încercat să elucideze mecanismele prin care insulinorezistenţa participă la apariţia şi dezvoltarea calcificărilor vasculare (46). Aceştia au demonstrat că tratarea CMNV (prelevate de la şobolani) cu nivele crescute de insulină şi fosfat anorganic (Pi) determină o scădere a procesului de calcificare matriceală. Interesant este că blocarea atât a căii PI3K, cât şi cea MAPKs, atenuează acest efect inhibitor exercitat de către insulină asupra procesului de mineralizare. Statusul de insulinorezistenţă se caracterizează prin asocierea hiperinsulinemiei cu blocarea căii PI3K. Blocarea ,,good pathway'' determină dispariţia efectului protectiv exercitat de către insulină asupra calcificării CMNV. Surpriza cercetătorilor a fost să constate că inhibarea căii proaterogenice MAPK determină, de asemenea, o amplificare a procesului de calcificare vasculară.

Coroborarea acestor date sugerează că ambele căi de transmitere a semnalelor insulinice la nivel intracelular sunt necesare pentru a inhiba procesul de calcificare şi demonstrează că, în acest caz, nu asistăm la o dihotomie clară între ,,good pathway'' şi ,,bad pathway''. Cele două căi sunt total antagoniste în cazul altor procese celulare; în cazul procesului de calcificare vasculară ele interacţionează prin intermediul unor semnale stimulatorii sau inhibitorii (47).

Mecanismul central prin care insulina exercită efect protector împotriva mineralizării vasculare este reprezentat de stimularea transportului fosfatului în CMNV. Acesta se realizează, în principal, prin creşterea capacităţii de transport (Vmax) şi mai puţin prin creşterea afinităţii pentru fosfat (Km). Creşterea Vmax sugerează o creştere a expresiei transporterilor activi la nivelul membranei plasmatice. Co-transporterii de potasiu dependenţi de sodiu (Na/Pi) de tip III- Pit-1 şi Pit-2 - au o distribuţie ubicvitară în organism (inclusiv CMNV), în timp ce tipurile I, IIa, IIb şi IIc se regăsesc la nivel renal sau în alte ţesuturi, dar nu şi la nivelul CMNV (48,49). Insulina determină o amplificare a expresiei Pit-1 şi Pit-2 via ERK1/2-MAPkinază. Inhibarea căii MAPK anulează aceste efecte exercitate de către insulină.

Aportul Pi prin Pit-1 induce transdiferenţierea osteogenică a CMNV (50). În plus, Pit-1 reduce mineralizarea matriceală indusă de fosfat şi conversia fenotipică a CMNV (51). Aceste date sugerează că există şi alţi factori care intervin în procesul de calcificare indus de insulină, fosfataza alca-

lină fiind unul dintre aceştia. Tratarea celulelor calcifiante vasculare (CVC) cu IGF-1 a determinat o inhibare a mineralizării matriceale prin scăderea activităţii fosfatazei alcaline (FA) (52).

Acest efect poate fi prevenit prin inhibarea celor două căi de transmitere a semnalelor insulinice, PI3K şi MAPK. În studiile efectuate pe modele animale diabetice de calcificare vasculară (şoareci şi şobolani) s-a demonstrat că la nivelul specimenelor arteriale calcificate se înregistrează o creştere a reglării FA (53).

Coroborarea acestor date sugerează abilitatea insulinei de a preveni calcificarea vasculară prin inhibarea fosfatazei alcaline şi prezervarea nivelelor de pirofosfat anorganic cu rol protector.

Pirofosfatul anorganic este produs prin acţiunea ectonucleotid pirofosfataz-fosfodiesterazei 1 (ENPP1 sau PC-1), o glicoproteină de la nivelul membranei plasmatice. Există studii care au demonstrat că *amplificarea expresiei PC-1 se corelează cu insulinorezistenţa*. Fibroblaştii prelevaţi de la pacienţi diabetici prezintă o amplificare a expresiei PC-1 comparativ cu pacienţi control nediabetici (54); şoarecii care prezintă o creştere a expresiei PC-1 dezvoltă insulinorezistenţa şi hiperglicemie (55); polimorfismul PC-1 se asociază la om cu obezitatea şi insulinorezistenţa (56).

Deşi mecanismul nu este complet elucidat, se presupune că PC-1 poate preveni activarea receptorului insulinic prin blocarea autofosforilării acestuia (57). Toate aceste date sugerează posibilitatea ca PC-1 - factor implicat în reglarea depunerilor de calciu, dar şi în reglarea sensibilităţii la insulină - să fie implicat şi în procesul de calcificare arterială la nivel de tunică medie la pacienţii diabetici. Concentraţia extracelulară a PPi este asigurată de echilibrul între PC-1 şi FA; este posibil ca amplificarea expresiei PC-1 să fie urmată de o creştere a activităţii FA pentru a antagoniza producţia de PPi, determinând astfel o creştere a fosfatului anorganic ce moduleaza fenotipic CMNV şi amplifică depunerile de calciu.

- ***Chlamydia pneumoniae***

Numeroase studii au încercat să elucideze rolul *Chlamydia pneumoniae* în procesul de aterogeneză şi calcificare arterială (58,59,60,61), dar încă nu s-a stabilit cu exactitate dacă prezenţa sa reprezintă un fenomen cauzativ sau concomitent. Există până în prezent puţine studii care au investigat o posibilă asociere între *C. pneumoniae* şi calcificările vasculare (62,63).

Lehto et al. (64) au semnalat că anticorpii anti-*C. pneumoniae* sunt strâns corelaţi cu prezenţa calcificărilor intimale la nivelul arterelor femurale. Un aspect interesant este faptul că prezenţa *C. pneumoniae* în specimenele arteriale nu se corelează cu vârsta sau sexul pacienţilor, durata istoricului bolii aterosclerotice, a infecţiei cu *C. pneumoniae*, sau cu alte date clinice. Ipoteza etiologiei infecţioase a calcificărilor vasculare a fost relativ recent lansată, sugerându-se că în procesul de calcificare la nivel arterial *C. pneumoniae* joacă roluri diferite la nivel intimal şi medial, generând tipuri diferite de leziuni.

Bobryshev a fost printre primii care a sugerat existenţa unei relaţii între prezenţa *C. pneumoniae* şi calcificarile vasculare la nivel de media (65). În studiul efectuat *in vitro* pe specimene arteriale aterosclerotice umane, imunopozitivitatea pentru *C. pneumoniae* a fost detectată doar în situsurile de calcificare precoce de la nivel medial, nu şi la nivelul depozitelor mature de calciu. Aceasta sugerează că *C. pneumoniae joacă un rol în etapele iniţiale ale procesului de calcificare medială;* odată instalat procesul de calcificare, antigenii *C. pneumoniae* devin nedetectabili sau sunt distruşi. Studii *in vitro* demonstreaza ca *C. pneumoniae* afectează proliferarea CMNV, determină creşterea producerii de citokine şi metaloproteinaze matriceale 1 si 3 de către CMNV, producând în final moartea CMNV.

Toate aceste rezultate susţin ipoteza conform căreia *C. pneumoniae* poate să nu fie doar o prezenţă accidentală la nivelul peretelui arterial.

MECANISME DE INHIBARE A PROCESULUI DE CALCIFICARE MEDIALĂ

Apariţia mediocalcinozei diabetice este şi rezultatul decompensării mecanismelor de inhibare a procesului de calcificare reprezentate de: MGP (matrix carboxyglutamic acid Gla protein), OPN (osteopontina), Fetuina-a, β-glucozidaza, Desmina, Smad 6, Anhidraza carbonică II, OPG (osteoprotegerina), PPi (Pirofosfatul anorganic).

- **Pirofosfatul anorganic** este un puternic inhibitor al calcificărilor vasculare şi este recunoscut acum ca fiind un factor paracrin vascular implicat în medierea acestui proces.

El serveşte ca substrat pentru fosfataza alcalină, nivelul de pirofosfat fiind menţinut prin activitatea NPP1 (ectonucleotid pirofosfataz/fosfodiesteraza I) şi a exporterului celular de pirofosfat – ankyrin (ANK) (66). Mecanismul prin care pirofosfatul modulează calcificările vasculare este reprezentat de o inhibiţie directă fizico-chimică a formării hidroxiapatitei şi o prevenire a propagării depunerilor de calciu la nivel tisular. Recent s-a dovedit însă că pirofosfatul previne de asemenea şi tranziţia CMNV către un fenotip osteo-condrogenic, dar aceasta modificare fenotipică nu se asociază cu o creştere a BMP2 (67). Toate aceste date sugerează că normalizarea nivelului de pirofosfat prin inhibarea fosfatazei alcaline, creşterea nivelului de NPP1 sau inducerea secreţiei de pirofosfat intracelular prin intermediul ANK poate constitui o strategie pentru limitarea calcificărilor vasculare.

- **Proteina matriceală Gla** (MGP – matrix Gla protein) joacă un rol complex în apariţia şi dezvoltarea calcificărilor arteriale, fiind implicată atât în modularea diferenţierii celulare, cât şi a procesului de calcificare; mecanismele de acţiune nu sunt însă pe deplin elucidate.

MGP acţioneaza prin inhibarea interacţiunii BMP/BMPR2, dar şi prin legarea directă de BMP2 (68). Astfel, depunerea de minerale şi diferentierea osteogenică sunt reglate de raportul relativ dintre MGP si BMP2; o valoare scăzută (< 1x) sau crescută (> 15x) favorizează calcificările vasculare, în timp ce valorile intermediare (1-15x) inhibă acest proces.

Pentru a fi pe deplin funcţională, MGP necesită o γ-carboxilare dependentă de vitamina K, proces care se desfaşoară la nivelul reticulului endoplasmatic. După γ-carboxilare, MGP suferă o modificare conformaţională care îi permite să lege calciul; acest proces este necesar pentru formarea complexului MGP/BMP2. Complexul format previne interacţiunea BMP2 cu receptorul sau BMPR2.

Fetuina-a, un alt puternic inhibitor al calcificărilor vasculare, poate transporta la nivel plasmatic forma γ-carboxilată a MGP, dar nu şi forma non-carboxilată. Forma non-γ-carboxilată a MGP este asociată cu procesul de calcificare arterială, în timp ce forma γ-carboxilată se regăseşte la nivelul vaselor normale (69).

Studiile efectuate la pacienţi au demonstrat că nivelul calcificărilor coronariene (determinate prin EBCT) se corelează cu nivelul plasmatic de MGP (70). MGP a fost identificată în situsurile de calcificare arterială. Creşterea expresiei MGP de către CMNV în leziunile de mediocalcinoză ar putea reprezenta o încercare de a amplifica clearance-ul calciului de la acest nivel. Aceste date reflectă probabil o încercare a organismului de a menţine homeostazia vasculară. Este posibil ca acest mecanism să fie depăşit în anumite circumstanţe, înaintea apariţiei calcificărilor aterosclerotice sau

mediale survenind probabil o scădere globală a MGP (71). Expresia MGP este scăzută în vasele afectate de mediocalcinoză, ceea ce sugerează că scăderea MGP este corelată cu apariţia calcificărilor mediale.

• **Osteoprotegerina şi osteopontina** sunt, de asemenea, factori de inhibare a procesului de calcificare arterială. S-a demonstrat că există o legătură genetică între OPG, RANK şi RANKL şi apariţia şi dezvoltarea calcificărilor vasculare. Osteoprotegerina îşi exercită efectul antimineralizant prin perturbarea legării ligandului receptorului activator al factorului nuclear kapa-B (RANKL) de receptorul specific, dar şi prin prevenirea transformării fenotipice a CMNV către un profil osteoblast-like.

Osteopontina joacă un rol mai complex în procesul de calcificare vasculară; ea are nu doar rol inhibitor al calcificării, prin inhibarea formării cristalelor de hidroxiapatită, dar este implicată şi în regresia leziunilor de calcificare, prin acidifierea matricei extracelulare (72,73).

• **Fetuina-a**. Spre deosebire de OPN, OPG şi MGP care exercită o acţiune *paracrină* de inhibare a procesului de calcificare la nivelul peretelui vascular, fetuina, cunoscută şi sub denumirea de glicoproteina α2-Heremans-Schmid (Ahsg), este un *inhibitor circulant* al calcificărilor vasculare. *In vitro*, fetuina inhibă formarea de novo a cristalelor de hidroxiapatită, dar ea nu-şi mai poate exercita acţiunea odată ce cristalele de hidroxiapatita sunt deja formate. Fetuina controlează şi metabolismul veziculelor matriceale (74). Importanţa acestui factor în apariţia calcificărilor ectopice a fost demonstrată şi de studii pe animale care au dovedit că deficitul de fetuină generat de cauze genetice, metabolice sau inflamatorii determină apariţia unor calcificări importante în ţesuturi moi (miocard, rinichi, limba şi piele) (75,76).

La pacienţii diabetici, nivelele de fetuina-a se corelează cu insulinorezistenţa. Studiile au demonstrat că la pacienţii diabetici cu IRC se constată o creştere iniţială a nivelelor de fetuină care acţionează ca mecanism protector împotriva calcificărilor vasculare ("early warning system"). Prezenţa în cantităţi mari a fetuinei la nivelul zonelor de calcificare arterială analizate imuno-histochimic susţine această ipoteză a hipersecreţiei iniţiale adaptative de fetuină. Evoluţia bolii renale atrage după sine o epuizare a acestui mecanism compensator, determinând deficitul de fetuină şi progresia calcificărilor vasculare.

• **Smad 6** este un inhibitor specific al BMP, el acţionând la nivelul căii de transmitere intracelulară semnalelor prin receptorul BMP-BMPR2. Şoarecii cu deleţia totală a Smad 6 prezintă calcificări ectopice extinse în toate straturile peretelui arterial şi leziuni de metaplazie cartilaginoasă la nivelul tractului de ejecţie aortic (77).

Mecanismele celulare implicate în apariţia calcificărilor arteriale continuă să fie studiate. Există teorii diverse privind fiziopatologia acestui proces, dar numitorul comun acceptat este reprezentat de interacţiunea complexă între procesul de inhibiţie şi cel de promovare a calcificării.

Studiile efectuate până în prezent au deschis calea unor noi perspective terapeutice; normalizarea nivelului de pirofosfat prin inhibarea fosfatazei alcaline, creşterea nivelului de NPP1 sau inducerea secreţiei de pirofosfat intracelular prin intermediul ANK pot constitui o strategie pentru limitarea calcificărilor vasculare. De asemenea, utilizarea osteopontinei, osteoprotegerinei, fetuinei sau implantului de osteoclaste la nivelul zonelor arteriale calcificate pentru a preveni, limita sau diminua procesul de calcificare arterială reprezintă variante terapeutice atractive.

Acestor potenţiali factori terapeutici li se adaugă bifosfonaţii (ibandronat si alendronat), statinele (atorvastatina), blocaţii de calciu (nifedipina, amlodipina), sevelamer (chelator de fosfat care nu conţine calciu), analogi de vitamina D (para-calcitriol) sau agenţi calcimimetici (AMG 073) care şi-au dovedit deja eficacitatea în studii clinice în prevenţia şi regresia calcificărilor arteriale.

BIBLIOGRAFIE

1. Vattikuti R, Towler DA. Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 286: E686-E696.
2. Virchow R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Atheromatous affection of arteries. *Nutr Rev* 1858; 47: 23-25.
3. Tanimura T, McGregor A, Anderson HC. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 172: 173-177.
4. Demer M, Tintut A. Return to ectopia: stem cells in the artery wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1307-1308.
5. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. *Circulation* 2007; 115: 377-386.
6. Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 1998; 273: 30427-30434.
7. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 525-531.
8. Reaven PD, Sacks J. Coronary artery and abdominal aortic calcification are associated with cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 379-385.
9. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 2004; 91: 1800-1809.
10. Bobryshev YV, Cao W, Phoon MC et al. Detection of Chlamydophila pneumoniae in dendritic cells in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 2004; 173: 185-195.
11. Campbell LA, Kuo CC. Chlamydia pneumoniae—an infectious risk factor for atherosclerosis? *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 23-32.
12. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnemaa T, Laakso M. Medial artery calcification. A neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 978-983.
13. London GM, Marty A, Marchais M et al. Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1943-1951.
14. Safar M, Boudier A. Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. *Hypertension* 2005; 46: 205-209.
15. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1161-1170.
16. Agmon Y, Khandheria BK, Jamil Tajik A et al. Inflammation, infection, and aortic valve sclerosis: insights from the Olmsted County (Minnesota) population. *Atherosclerosis* 2004; 174: 337-342.
17. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2857-2867.
18. Shao JS, Cai J, Towler DA. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1423-1430.
19. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374.

20. Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 1998; 273: 30427-30434.
21. Satokata I, Ma L, Ohshima H et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; 24: 391-395.
22. Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005; 115: 1210-1220.
23. McMahon R, Murphy M, Clarkson M et al. IHG-2, a mesangial cell gene induced by high glucose, is human gremlin. Regulation by extracellular glucose concentration, cyclic mechanical strain, and transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 2000; 275: 9901-9904.
24. Sorescu GP, Song H, Tressel SL et al. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase. *Circ Res* 2004; 95: 773-779.
25. Csiszar A, Smith KE, Koller A, Kaley G, Edwards JG, Ungvari Z. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression in endothelial cells: role of nuclear factor-kappaB activation by tumor necrosis factoralpha, H2O2, and high intravascular pressure. *Circulation* 2005; 111: 2364-2372.
26. Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, Xu Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004; 113: 1258-1265.
27. Cheng Y, Shao T, Mae M. et al. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 45969-45977.
28. Tintut Y, Alfonso Z, Saini T et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003; 108: 2505-2510.
29. Ichida C, Nishimura M, Hata T et al. Reciprocal roles of MSX2 in regulation of osteoblast and adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279: 34015-34022.
30. Johnson A, Nusse A, Tintut Y et al. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1749-1757.
31. Hu H, Hilton MJ, Tu X et al. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *J Biol Chem* 2005; 132: 49-60.
32. Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, Fukai N, Zurakowski D, Zeng X. Loss of collagen XVIII enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis. *Circulation* 2004; 110: 1330-1336.
33. Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D et al. Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 4736-4741.
34. Shoji T, Emoto M, Shinohara K et al. Diabetes mellitus, aortic stiffness, and cardiovascular mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2117-2124.
35. Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res* 2005; 96: 930-938.
36. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Leptin. *Endocrinol* 2004; 145 (11): 4880-4889.
37. Marsh AJ, Fontes MA, Killinger S, Pawlak DB, Polson JW, Dampney RA. Leptin. *Hypertension* 2003; 42 (4): 488-493.
38. Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Leptin. *Hypertension* 2005; 45: 9-14.
39. Galvez B, de Castro J, Herold D, Dubrovska G, Arribas S et al. Leptin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (6): 1297-1302.
40. Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002; 111: 305-317.
41. Chen NX, Duan D, O'Neill KD, Moe SM. High glucose increases the expression of Cbfa1 and BMP-2 and enhances the calcification of vascular smooth muscle cells. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 34-35.
42. Olesen P, Nguyen K, Wogensen L, Ledet T, Rasmussen LM. Calcification of human vascular smooth muscle cells: associations with osteoprotegerin expression and acceleration by high-dose

insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1058-1064.
43. White M. Insulin signaling in health and disease. *Science* 2003; 302: 1710-1711.
44. Cusi K, Maezono K, Osman A et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105: 311-320.
45. Stout R. Hyperinsulinemia and atherosclerosis. *Diabetes* 1996; 45 (Suppl 3): S45-S46.
46. Wang C, Sorribas V, Sharma G, Levi M, Draznin B. Insulin attenuates vascular smooth muscle calcification but increases vascular smooth muscle cell phosphate transport, *Atherosclerosis* 2007; in press, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.02.032.
47. Ceolotto G, Bevilacqua M, Papparella I et al. Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3_-kinasedependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo. *Diabetes* 2004; 53: 1344-1351.
48. Li X,YangHY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2006; 98 (7): 905-912.
49. Collins JF, Bai L, Ghishan FK. The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors. *Pflugers Arch* 2004; 447 (5): 647-652.
50. Jono S, McKee MD, Murry CE et al. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; 87: E7-10.
51. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2006; 98: 905-912.
52. Radcliff K, Tang TB, Lim J et al. Insulin-like growth factor-I regulates proliferation and osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells via extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circ Res* 2005; 96: 398-400.
53. Bouvet C, Peeters W, Moreau S, DeBlois D, Moreau P. A new rat model of diabetic macro-vascular complication. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 504-511.
54. Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S et al. Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995; 373: 448-451.
55. Maddux BA, Chang YN, Accili D et al. Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E746-749.
56. Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A et al. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* 2005; 37: 863-867.
57. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 873-891.
58. Bishara J, Pitlik S, Kazakov A et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae by cell culture and polymerase chain reaction in major arteries of 93 patients with atherosclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22: 300-302.
59. Campbell LA, Kuo CC, Grayston JT. Chlamydia pneumoniae and cardiovascular disease. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 571-579.
60. De Boer OJ, van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerosis, inflammation, and infection. *J Pathol* 2000; 190: 237-243.
61. Kalayoglu MV, Libby P, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae as an emerging risk factor in cardiovascular disease. *JAMA* 2002; 288: 2724-2731.
62. Agmon Y, Khandheria BK, Jamil Tajik A et al. Inflammation, infection, and aortic valve sclerosis: insights from the Olmsted County (Minnesota) population. *Atherosclerosis* 2004; 174: 337-342.
63. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R et al. Pathogenetic role of Chlamydia pneumoniae in calcific aortic stenosis: immunohistochemistry study and review of the literature. *J Heart Valve Dis* 2003; 12: 447-453.
64. Lehto S, Niskanen L, Suhonen M, Ronnemaa T, Saikku P, Laakso M. Association between Chlamydia pneumoniae antibodies and intimal calcification in femoral arteries of nondiabetic patients. *Arch Intern Med* 2002; 162: 594-599.

65. Bobryshev YV, Lord RSA, Dinh T. *Chlamydia pneumoniae* in foci of "early" calcification of the tunica media in arteriosclerotic arteries : an incidental presence ? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 ; 290 : H1510-H1519.
66. Johnson K, Polewski M, van Etten D, Terkeltaub R. Chondrogenesis mediated by PPi depletion promotes spontaneous aortic calcification in NPP1-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 686-691.
67. Towler DA. Inorganic pyrophosphate : a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 651- 654.
68. Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 4388-4394.
69. Schurgers LJ, Teunissen KJ, Knapen MH et al. Novel conformation-specific antibodies against matrix gammacarboxyglutamic acid (Gla) protein : undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ; 25 : 1629-1633.
70. Jono S, Ikari Y, Vermeer C et al. Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004 ; 91 : 790-794.
71. Hao H, Hirota S, Ishibashi-Ueda H, Kushiro T, Kanmatsuse K, Yutani C. Expression of matrix Gla protein and osteonectin mRNA by human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol* 2004 ; 13 : 195-202.
72. Steitz SA, Speer MY, McKee MD et al. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002 ; 161 : 2035-2046.
73. Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004 ; 36 : 57-66.
74. Reynolds JL, Skepper JN, McNair R et al. Multifunctional roles for serum protein fetuin-a in inhibition of human vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16 : 2920-2930.
75. Merx MW, Schafer C, Westenfeld R et al. Myocardial stiffness, cardiac remodeling, and diastolic dysfunction in calcification-prone fetuin-Adeficient mice. *J Am Soc Nephrol* 2005 ; 16 : 3357-3364.
76. Ketteler M. Fetuin-A and extraosseous calcification in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005 ; 14 : 337-342.
77. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA et al. A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000 ; 24 : 171-174.

NOUTĂŢI

UTILIZAREA PREPARATULUI ETANERCEPT ÎN TRATAMENTUL COPIILOR ŞI ADOLESCENŢILOR CU PSORIAZIS

Preparatul Etanercept, inhibitor al factorului de necroză tumorală, a fost testat în psoriazisul adultului cu rezultate favorabile şi autorii studiului de faţă propun utilizarea sa şi la tineri adolescenţi sau copii. Cercetarea s-a derulat pe 48 de săptămâni, incluzând 211 pacienţi cu psoriazis cu vârste între 4 şi 17 ani. Preparatul a fost administrat 12 săptămâni la doza de 0,8 mg/kg după care s-a efectuat prima evaluare şi s-a decis întreruperea tratamentului sau continuarea în manieră deschisă. În săptămâna 12, scorul de ameliorare a manifestărilor psoriazisului PASI 75 a fost realizat în proporţie de 57% la pacienţii din lotul cu Etanercept, faţă de lotul placebo unde s-a realizat în proporţie de 11% ($p<0,001$). Ulterior, în grupul cu Etanercept, semnificativ mai mulţi pacienţi au avut scoruri ameliorate PASI 50 (75% vs 23%), PASI 90 (27% vs 7%). În timpul perioadei de întrerupere, între săptămâna 36-48, răspunsul terapeutic s-a pierdut la 29 din 69 pacienţi (42%). 4 cazuri de efecte adverse (inclusiv 3 infecţii) au apărut pe parcursul tratamentului cu Etanercept (Paller AS, Siegfried EC et al. Etanercept treatment for children and adolescents with plaque psoriasis. *N Engl J Med* 2008, 358 : 241-251).

Corina Dima-Cozma

NUTRIŢIA COPILULUI CU GREUTATE MICĂ LA NAŞTERE

Cristiana Dragomir, Laura Florescu, Magdalena Stârcea
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Disciplina de Puericultură

NUTRITION OF LOW BIRTH WEIGHT INFANT (Abstract) : The low birth weight infant's (LBW) nutrition needs special attention. Energy requirements are increased due to a high metabolic rate and a low thermogenesis. Increased protein requirements are, easy to be absorbed (from lactoserum). Lipids, as important energetic source requires an apropiate content in essential fatty acids and medium chain triglycerides (TGM) which are easy absorbed in absence of lipase and deficit of bile salt secretion. The carbohydrates should be represented by lactose or equivalents like di-, oligo or polysaccharides. The addition of maltodextrin avoid an exaggerat apport and incomplete digestion of lactose. Sodium requirement are increased due to exaggerated loss consequence of renal immaturity. The rapid rate of growth impose the addition of Calcium, Phosphorus, Iron, Copper, and vitamins, especialy Vitamin D, E and Folic acid. The appropriate nutrition of LBW must cover his special needs to maintain the homeostasis and rapid growth. Precise nutrient requirements are, however, difficult to establish. **Key words** : LBW INFANT, NUTRITION, NUTRITIONAL REQUIREMENTS

Preocuparea pentru nutriţia raţională a copilului rămâne de mare actualitate în lumea contemporană, în care dezvoltarea acestuia este ameninţată fie de malnutriţie, fie de obezitate, fie de hipo- sau hipervitaminoze.

Nutriţia copilului cu greutate mică la naştere (LBW) implică o atenţie deosebită deoarece :

- imaturitatea renală şi insuficienţele metabolice fac să fie mai puţin apt în a-şi menţine homeostazia ;
- aportul nutrienţilor este mult mai mare pentru a acoperi necesităţile unei creşteri rapide.

Obiectivele managementului nutriţional al acestor copii sunt menţinerea homeostaziei şi o creştere rapidă.

1. Necesarul energetic la copilul cu greutate mică la naştere este mai mare decât la copilul născut la termen deoarece :

- necesită mai multă energie pentru creştere şi termoreglare ;
- rata metabolismului bazal este crescută ;
- are rezerve scăzute de energie ;
- pierderile digestive de nutrienţi sunt mai mari (1,2).

Necesarul energetic :

- 130 kcal/kg/zi (ESPGHAN,1987)
- 110 - 135 kcal/kg/zi (Expert Panel, 2002)
- 20 kcal/kg/zi (Tsang et al., 1993)

Pentru compensarea intoleranţei la volume mari se vor utiliza formule care să ofere mai multă energie la 100 ml decât formulele standard (formulele speciale pentru prematur conţin 80 kcal/100ml) (1,5).

2. Necesarul în proteine, aminoacizi şi alte substanţe azotate

Patru factori determină cantitatea şi calitatea proteinelor necesare copilului cu

greutate mică la naştere:

- necesarul proteic pentru creştere;
- sinteza de proteine şi metabolismul aminoacizilor:
- funcţia renală;
- energia ingerată şi cea utilizată pentru creştere (1,2).

Necesarul proteic:

- 2,9 – 4,0 g/kg/zi (ESPGHAN, 1987)
- 3,6 - 3,8 g/kg/zi (dacă greutatea la naştere < 1000 g) (Tsang et al, 1993)
- 3,0 - 3,6 g/kg/zi (dacă greutatea la naştere > 1000 g) (Tsang et al, 1993)

Expert Panel recomandă ca minimul concentraţiei proteice în formulele pentru prematuri să fie de 2,5g/100kcal, specificând că această valoare se referă la cantitatea totală de proteine (g totale de azot x 6,25), iar maximul concentraţiei proteice să fie de 3,6 g/100kcal (1,3,4).

Sinteza de proteine şi metabolismul aminoacizilor

- Metabolismul aminoacizilor este imatur la prematur.
- Unii aminoacizi neesenţiali (taurina, cisteina, glicina) sunt esenţiali pentru copilul cu greutate mică la naştere.(5)
- Catabolismul aminoacizilor este incomplet, ingestia de cantităţi mari de proteine ar putea duce la concentraţii plasmatice crescute de aminoacizi (metionină, fenilalanină), ioni de hidrogen şi uree.

Funcţia renală

Funcţia renală este imatură la copilul cu greutate mică la naştere şi ca urmare reabsorbţia aminoacizilor este limitată.

Energia ingerată şi cea utilizată pentru creştere

Raportul dintre aportul proteic şi cel energetic este important.

Dacă aportul energetic este *inadecvat*, administrarea proteinelor în cantitate ce depăşeşte necesarul de sinteză duce la *stresarea* mecanismelor metabolice.

Dacă aportul energetic este *adecvat* necesităţilor aceleaşi proteine ingerate pot duce la îmbunătăţirea sporului ponderal şi la o retenţie mai bună a azotului.

Raportul cazeină / proteine din lactoser

Sunt preferate formule care au *raportul 40 : 60*, asemănător cu cel din laptele matern şi care respectă:

- compoziţia în aminoacizi;
- digestibilitatea (grunji de cazeină mici şi moi);
- evacuarea gastrică (mai multă cazeină înseamnă o evacuare mai lentă);
- stimularea florei intestinale.

Calitatea proteinelor

Aminoacizii esenţiali clasici, bază pentru creştere şi balanţa de azot sunt: fenilananina, histidina, izoleucina, leucina, lizina, metionina, treonina, triptofanul, valina. Aminoacizii condiţionat esenţiali, necesari în timpul dezvoltării precoce datorită imaturităţii metabolice a prematurului sunt: arginina, cisteina, glicina, taurina, tirozina (1,5).

3. Necesarul glucidic

Cantitatea de glucide administrată copilului cu greutate mică la naştere trebuie să asigure:

- prevenirea hipoglicemiei;
- energia totală necesară pentru întreţinere şi creştere;
- toleranţa intestinală la hidrocarbonate.

Glucidele sunt sursă majoră de energie la copil şi adult.

Principala formă de circulaţie în organism este glucoza, sursă primară de energie pentru creier şi importantă sursă de carbon pentru sinteza de novo a acizilor graşi şi a câtorva aminoacizi neesenţiali.

Prematurul este capabil să oxideze cantităţi mari de glucoză pentru a furniza energia necesară (1,2).

Necesarul de glucide: 7-14 g/100 kcal (ESPGHAN, 1987)

Expert Panel recomandă ca nivelul glucidelor în formulele pentru prematur să fie între 9,6 şi 12,5 g/100 kcal (lactoză sau echivalente di-, oligo-, sau polizaharide).

Lactoza creşte absorbţia de calciu şi magneziu şi este suport pentru dezvoltarea florei intestinale. Intoleranţa la lactoză este doar un fenomen tranzitoriu la copilul cu greutate mică la naştere.

Glucoza este absorbită rapid, dar datorită hiperosmolarităţii pe care o induce, poate produce diaree osmotică. Utilizarea ei este limitată, deşi este principalul nutrient folosit de creierul nou născutului.

Maltodextrina şi zaharurile derivate din siropul de porumb sunt uşor digerate de amilaza salivară şi de glucoamilaza intestinală (deplin dezvoltată în marginea în perie a mucoasei intestinale la nou născut).

Amidonul nu poate fi utilizat ca sursă de hidrocarbonate datorită incompletei dezvoltări a amilazei pancreatice.

Oligozaharidele intervin în dezvoltarea florei saprofite şi inhibă creşterea florei patogene din intestinul gros. Acizii graşi cu lanţ scurt rezultaţi din fermentaţia oligozaharidelor sunt sursă energetică pentru colonocite şi pentru întregul organism. Unele studii sugerează că oligozaharidele din laptele uman au activitate antiinfecţioasă în tractul gastrointestinal, renal şi respirator. Concentraţia oligozaharidelor pare a fi mai mare în laptele mamelor care au copil prematur faţă de laptele mamelor care au născut la termen (1,5).

Rolul oligozaharidelor în nutriţia copilului cu greutate mică la naştere nu este încă bine evaluat.

4. Necesarul lipidic

Absorbţia grăsimilor este influenţată de:

- imaturitatea mecanismelor de metabolizare (secreţia de lipază pancretică şi săruri biliare);
- lungimea lanţurilor şi gradul de saturare a acizilor graşi;
- tipul de lipid ingerat (grasimile vegetale sunt mai uşor absorbite decât cele animale, acizii graşi nesaturaţi cu lanţ lung (C_{12}), sunt mai bine absorbiţi decât cei saturaţi cu acelaşi număr de atomi de carbon).

Necesarul de lipide: 4.4 - 6.0 g/ 100 kcal (ESPGHAN, 1987)

Expert Panel recomandă ca lipidele conţinute în formulele pentru prematuri să fie cuprinse între 4,4 – 5,7g/100 kcal.

Trigliceridele cu lanţ mediu (MCT) sunt uşor digerabile, dar un exces alimentar poate determina diaree şi vărsături. ESPGHAN recomandă ca MCT să fie maxim 40% din lipidele conţinute de formulele pentru prematuri.

Acizii graşi esenţiali pot fi deficienţi la copilul cu greutate mică la naştere datorită:

- malabsorbţiei lipidelor;
- ritmului rapid de creştere;
- rezervelor scăzute de grăsimi.

Acidul arahidonic (AA) şi acidul docosahexaenoic (DHA) sunt consideraţi esenţiali pentru copilul cu greutate mică la naştere. Este importantă nu numai cantitatea de acizi graşi esenţiali ci şi proporţia dintre aceştia.

Acizii graşi polinesaturaţi cu lanţ lung (LC - PUFA) conţinând 20- 22 atomi de carbon sunt componente importante ale fosfolipidelor membranare, în special a celor de la nivelul sistemului nervos şi retinei (6) Suplimentarea cu LC-PUFA a formulelor este recomandată la prematur, deoarece acesta nu este încă apt să elongheze şi să desatureze acidul linoleic şi a-linolenic în derivaţii lor cu lanţ lung AA şi DHA. Statusul DHA la prematur este corelat pozitiv cu acuitatea vizuală, iar nivelul AA se corelează cu creşterea şi scorul testelor de dezvoltare. Sursele sunt *uleiul de primula, uleiul de peşte* şi *gălbenuşul de ou*.

Acidul palmitic constituie 22% din lipidele laptelui uman matur şi 70-75% este esterificat în poziţia 2 (β). În formulele pentru sugari cu uleiuri vegetale acidul palmitic este esterificat în poziţia 1 şi 3. Absorbţia este mai bună atunci când acidul palmitic este esterificat în poziţia 2 decât în 1 şi 3. Formulele pentru prematuri conţin

mixturi de lipide şi acid b-palmitic esterificat în poziţia 2 ca în laptele uman. Efectul său este corelat şi cu o bună absorbţie a calciului, la copilul care primeşte formule cu acid palmitic esterificat în poziţia 2.

5. Necesarul de calciu şi fosfor

Boala metabolică a osului este una din deficienţele cele mai comune ale prematurului.

Absorbţia calciului este influentaţă de prezenţa vitaminei D_3 şi de fosforul din dietă.

Deficienţa de calciu şi fosfor are o contribuţie majoră la apariţia rahitismului şi a fracturilor la copilul cu greutate mică la naştere.

Aportul zilnic de vitamina D trebuie să fie de 800-1600 UI (20-40 ěg).

Suplimentarea cu vitamina D_3 a alimentaţiei este necesară pentru că:

- prematurul creşte rapid;
- rezervele de vitamină D_3 sunt mici;
- metabolismul vitaminei D_3 nu este complet dezvoltat;
- metabolismul lipidic nu este optimal şi afectează absorbţia vitaminei D_3.

Deficienţa de vitamină D_3 poate fi cauza tetaniei neonatale indusă de hipocalcemie. Aportul excesiv de calciu determină acidoză metabolică, iar aportul excesiv de fosfor hiperfosfatemie şi hipocalcemie.

Necesarul de calciu la LBW este de 150-200 mg/kg/zi (1).

Necesarul de fosfor la LBW este de 110 - 125 mg/kg/zi (1).

Expert Panel recomandă o concentraţie a calciului în formulele pentru LBW între 123 şi 185 mg/100 kcal, cu un raport Ca/P de 1,7/1 sau 2/1.

6. Necesarul de fier

Prematurul are o *balanţă a fierului negativă* deoarece:

- se naşte cu depozite mici de fier;
- are o masă redusă de globule roşii;
- are o rată accelerată de creştere;
- sunt posibile frecvente sângerări.

TABELUL I

Necesarul de sodiu, clor, potasiu şi magneziu

Mineral	Necesar zilnic	Proprietăţi
Sodiu	39-63 mg/100 kcal	- cation major extracelular; - reglează volemia; - intervine în creşterea osoasă şi a ţesutului nervos .
Clor	60-160 mg/100 kcal	- anion extracelular; - reglează presiunea osmotică; - deficienţa duce la tulburări metabolice severe şi falimentul creşterii.
Potasiu	60-160 mg/100 kcal	- cation intracelular; -menţine potenţialul electric transmembranar; - reglează contractilitatea musculară şi transmiterea impulsului nervos.
Magneziu	6,8-17 mg/100 kcal	- al doilea cation intracelular, având rol de cofactor a mai mult de 300 enzime; - scade excitabilitatea neuromusculară, favorizează procesele de inhibiţie şi pătrunderea vitaminei B_6 în celula nervoasă; - diminuă conductibilitatea şi excitabilitatea miocardului, are acţiune trofică vasculară; - stimulează formarea imunoglobulinelor, complementului seric şi fagocitoza; - cea mai mare cantitate este depozitată în os, de aceea mai mult de 30% din prematurii cu Gn < 1000g au o proastă mineralizare şi risc de osteopenie.

Se recomandă suplimentarea cu 2-2,5 mg/kg/zi, începând cu săptămâna a 8-a de viaţă (1,7).

Nu se suplimentează fierul dacă copilul primeşte transfuzii regulate.

Tsang (1993) recomandă suplimentarea cu 2 mg/kg/zi începând cu vârsta de două luni până la un an.

Expert Panel recomandă ca toate formulele pentru prematuri să fie suplimentate cu 1,7 - 3 mg fier/100 kcal.

7. Necesarul de sodiu, clor, potasiu şi magneziu este important de stabilit pentru a preveni creşterea presiunii osmotice faţă de rinichiul copilului cu greutate mică la naştere (tab. I).

8. Necesarul de microelemente

Microelementele sunt substanţe minerale existente în ţesuturi în concentraţii mici sub 1 mg/kg necesare bunei funcţionări a organismului. Ele sunt componente ale unor metalo-enzime sau activatori enzimatici şi participă la metabolismul principiilor nutritive, în procesul de creştere al organismului, maturaţia sexuală, funcţia sistemului nervos, hematopoieza (tab. II) (1,7).

9. Necesarul de vitamine liposolubile

Vitamina A - are un nivel scăzut la prematur deoarece are rezerve scăzute la naştere. Aceşti copii au riscul de a dezvolta

TABELUL II

Necesarul de microelemente

Micro elemente	Necesar	Proprietăţi
Zinc	**3- 5 mg/zi**	- rol esenţial în creşterea şi diferenţierea celulară; - participă la activitatea a peste 90 enzime; - intervine în sinteza lecitinei, aminoacizilor, cerebrozidelor şi surfactantului; -favorizează transportul transmembranar de glucoză şi răspunsul celular la insulină -participă la vindecarea plăgilor, stimulând sinteza colagenului; - contribuie la reglarea simţului olfactiv şi gustativ, la vederea nocturnă, menţinând nivelul plasmatic al vitaminei A.
Iod	**30-40 µg/zi**	- indispensabil în sinteza hormonilor tiroidieni
Crom	**43-82 ng /100 kcal**	- component structural al complexului „factorul de toleranţă la glucoză" având rol major în potenţarea acţiunii insulinei, pentru menţinerea unei homeostazii a metabolismului glucozei; - în metabolismul lipidic produce scăderea colesterolemiei (ateroscleroza şi hiperlipemia se corelează cu deficitul seric al cromului).
Seleniu	**3–4 µg/zi (0,9-2 µg/100 kcal)**	- componentă esenţială a sistemului enzimatic, al glutation peroxidazei, factor protectiv tisular contra stresului oxidativ.
Cupru	**0,25-0,30 mg/zi**	- component a numeroase metalo-enzime şi metalo-proteine care participă la formarea colagenului, elastinei şi melaninei; - participă la procesul de mielinizare a sistemului nervos prin citocromoxidază care are rol în sinteza fosfolipidelor; - esenţial în reacţiile de oxidoreducere.
Cobalt	**0,5 – 1 µg/zi**	- face parte din structura vitaminei B_{12} participând la eritropoieză.
Mangan	**0,5 – 1 mg/zi**	- activează glicozil transferaza implicată în sinteza mucopolizaharidelor necesare creşterii şi dezvoltării ţesutului conjunctiv, osului şi cartilajului; - intervine în oxidarea glucozei acţionând sinergic cu insulina; - participă la sinteza fosfolipidelor creierului şi a colesterolului.
Fluor	**25 µg/100 kcal**	- face parte din structura scheletului, smaltului dentar şi are rol în prevenirea cariilor; - încorporarea fluorului în dinţi începe la fătul de 4 luni odată cu mineralizarea mugurilor dentiţiei de lapte.

hipovitaminoză A.

β-carotenii sunt sursă de vitamina A şi antioxidanţi fiind adăugaţi în formulele pentru prematuri în concentraţii similare cu cele din laptele matern (40 μg/100 ml) (1).

Vitamina D - are o acţiune similară cu a parathormonului, intervenind în metabolismul calciului şi fosforului la nivel intestinal, renal şi osos.

Doza recomandată este de 1000 - 1200 UI/zi (25 *μg/zi*) (1).

Vitamina E - este un antioxidant în alimente şi ţesuturi. Are rol în sinteza hemului. O dietă bogată în fier necesită un aport suplimentar de vitamina E. Nevoile sunt legate şi de conţinutul dietei în acizi graşi polinesaturaţi (ac. linoleic). La prematur pe lângă rezervele scăzute în această vitamină, se asociază şi malabsorbţia. Doza recomandată este de 3 -5 mg/zi (1).

Vitamina K - este reprezentată de un grup de 10 compuşi liposolubili. Au fost sintetizaţi şi analogi hidrosolubili de vitamină K (fitomenadiona), utilizaţi în scopuri terapeutice. Toţi nou născuţii trebuie să primească 0,5-1mg vitamină K_1 intramuscular în prima zi de naştere, deoarece depozitele sunt mici, iar sinteza intestinală deficientă. Doza se repetă săptămânal până când alimentaţia devine corespunzătoare. Deficienţa de vitamină K_1 se manifestă prin boala hemoragică a noului născut.

10. Necesarul de vitamine hidrosolubile

Vitaminele hidrosolubile cuprind vitaminele din grupul B şi vitamina C. Vitaminele din grupul B îndeplinesc funcţii de coenzime sau faç parte din componenţa enzimelor care reglează metabolismul proteic, lipidic şi glucidic, intervin în funcţia sistemului nervos, a glandelor endocrine şi în hematopoieză.

- Vitamina B_1 (tiamina) – este necesară metabolismului glucidelor.

Se recomandă a fi prezentă în formulele pentru prematuri în concentraţie de 30 – 250 μg/100 kcal (1).

- Vitamina B_2 (riboflavina) – este necesară creşterii celulare. Recomandată în formulele pentru prematuri în concentraţii de 80-620μg/100kcal (1).
- Vitamina B_3 (niacina) – intervine în formarea coenzimelor ce au rolul de transfer al oxigenului în metabolismele celulare. Necesarul recomandat pentru prematuri 550 – 5000 μg/100 kcal (1).
- Vitamina B_5 (acidul pantotenic) – are rol în metabolismul hidrocarbonatelor, proteinelor şi grăsimilor, în transformarea colinei în acetilcolină (8). Formulele pentru prematuri trebuie să conţină 300 – 1900 μg/100 kcal (1).
- Vitamina B_6 (piridoxina) - intervine în metabolismul aminoacizilor şi lipidelor, stimulează creşterea şi eritropoeza, protejează mucoasele şi pielea. Cele trei forme naturale ale vitaminei B_6 (piridoxina, piridoxamina şi piridoxalul) sunt recomandate a fi prezente în formulele pentru prematuri în concentraţii de 30-250 μg/100kcal (1).
- Vitamina B_8 (biotina) – participă în metabolismul proteinelor, lipidelor şi glucidelor, precum şi activarea folatului. Nevoile la prematuri sunt 1-37 μg/100 kcal (1).
- Vitamina B_9 (acidul folic) – participă la sinteza bazelor purinice şi pirimidinice, intervine în sinteza ADN alături de vitamina B_{12} având rol în formarea hemoglobinei şi maturarea eritrocitelor, participă la sinteza proteică (8). Rezervele limitate precum şi ritmul accelerat de creştere la prematur, impun suplimentarea dietei cu acid folic, pentru a preveni apariţia anemiei megaloblastice. Expert Panel recomandă concentraţii de 30-45 μg/100 kcal. în formulele pentru prematuri.
- Vitamina B_{12} (cobalamina) - intervine în maturaţia măduvei roşii, în sinteza porfirinelor, acizilor nucleici şi a colinesterazei, scade acetilcolina şi participă la mielinizarea axonului celulei nervoase. Necesarul pentru prematuri 0,08 - 0,7 μg/100 kcal (1).

- Vitamina C - are un important rol în toate fenomenele de oxido-reducere, intervine în metabolismul proteinelor, lipidelor, glucidelor şi în metabolismul hormonilor corticosuprarenali, creşte rezistenţa organismului la infecţii şi intoxicaţii. Numeroasele sale implicări în procesele metabolice o fac indispensabilă unei nutriţii adecvate. Expert Panel recomandă concentraţii de 8,3-37 mg/100 kcal vitamină C în formulele pentru prematuri.

11. Necesarul de lichide

Apa este cel mai important nutrient. Organismul uman cu cât este mai tânăr, cu atât este mai vulnerabil la deshidratare. Datorită imaturităţii renale pierderile de apă sunt mai mari la prematur decât la nou născutul la termen. *Aportul lichidian minim pentru copilul cu greutate mică la naştere este de 130 ml/kg/zi.* Maximul aportului lichidian este determinat de abilitatea rinichiului imatur de a elimina apa, de aceea este foarte importantă monitorizarea depleţiei lichidiene.

Copilul cu greutate mică la naştere prezintă particularităţi ale funcţiei de nutriţie comparativ cu nou născutul la termen deoarece are o toleranţă digestivă scăzută care trebuie să facă faţă la un aport alimentar hipercaloric necesar pentru o creştere şi dezvoltare optimă.

În concepţia actuală, alimentaţia trebuie să asigure dezvoltarea normală a copilului, să prevină apariţia bolilor de nutriţie şi a degenerescenţelor vasculare.

BIBLIOGRAFIE

1. *** American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Nutritional needs of preterm infants. In: Kleinman RE editor. *Pediatric Nutrition Handbook*. 4th ed. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics, 1998, 55–87.
2. Klein CJ. Nutrient requirements for preterm infant formulas. *J Nutr* 2002, 132: 1395S-1577S.
3. Atkinson SA, Randall-Simpson J, Chang M, Paes B. Randomized trial of feeding nutrient enriched vs standard formula to premature infants during the first year of life. *Pediatr Res* 1999; 45: 276A (1626).
4. *** Canadian Pediatric Society, Nutrition Committee. Nutrient needs and feeding of premature infants. *Can Med Assoc J* 2005; 152: 1765-1785.
5. Schanler RJ, Shulman RJ, Lau C. Feeding strategies for preterm infants: beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics*.. 1999; 103: 1150–1157
6. Gibson RA, Chen W, Makrides MM. Randomized trials with polyunsaturated fatty acid interventions in preterm and term infants: functional and clinical outcomes. *Lipids* 2001; 36: 873-883.
7. Randall-Simpson J, Pelletier H, Paes B, Atkinson S. Iron, zinc and copper status of preterm infants: effects of mineral and protein-enriched infant formula. *Pediatr Res* 2000; 47: 295A (1743-1750).

INCUBATION OF THE CORONARY DISEASE PEDIATRIC PERSPECTIVE

S. Buzinschi
Universitatea "Transilvania" Braşov
Facultatea de Medicină

INCUBATION OF THE CORONARY DISEASE: PEDIATRIC PERSPECTIVE (Abstract): The atherosclerosis modifications at the vascular level are evidentiated early by diminishing the blood flow mediated vasodilatation, thickening of the arterial wall and the appearance since childhood of the aortic fibrose plates. Their evolution is determined mainly by the atherosclerotic dislipidemia. The maximum risk for atherosclerosis et alronary disease appears in the subjects with low birth weight which in the fetal period and childhood can develop epigenetic modifications in the tissues and organ development. The study proposes to collect the clinical, epidemiological, experimental and epigenetic data in an unified explanation of the induction mechanism of atherosclerosis. **Key words**: ATHEROSCLEROSIS, CHILDREN, D.N.A. METHYLATION

The pediatric origin of the adult's atherosclerotic disease is sustained by a high number of epidemiologic, clinical, experimental and pathological studies. A series of hypotheses sets the origins in the infant age and even in the intrauterine life. Experimental research at the molecular, cellular, metabolic, neuroendocrinal levels have established which are the disorders produced by the nutrition in the fetal period, and their effects on the cell proliferation and the differentiating process in different organs with consequences in the adult life (1). The atherosclerosis is characterized by the appearance of the lipid infiltrates in the arterial wall, accompanied by the recruiting of inflammatory and immune cells, the migration and proliferation of arterial smooth muscle cells and the gradual development of fibro cellular lesions rich in lipids(2).

Atherogen dislipidemia can be demonstrated in the groups of children at risk even starting with early age; taking all these into consideration, the role of other factors, like systemic inflammatory status, high values of plasmatic homocystein, the defects in the folates metabolism, is not well determined regarding the key stages of the atherogenetic process and its development. The asymptomatic disorders of the disease that last for decades can be evidentiated early in the process by: detection of the vascular modifications induced by blood flow, detection of the morphological changes of the arterial wall and the anatomicopathological changes that show early lesions of atherosclerosis (in connected circumstances)

THE DETECTION OF VASCULAR MODIFICATIONS MEDIATED BY BLOOD FLOW

Normally the caliber of the vessels is influenced by the blood flow. When the flow capacity rises , vasodilatation occurs and it overtakes a part of the flow induced tension. The vascular endothelium modulates the effects transmitted through the blood flow

by a lot of factors that influence the vascular tonus, the cellular adhesion, the coagulation, the inflammation, the permeability, all of them being implicated in the atherogenetic processes. Among them are the adhesion molecules (selectine), coagulation factors specific to the endothelium (von Willebrand), trombine endothelium receptors (trombomoduline ,assimilated like a marker of endothelial lesions) and vasoactive mediators, the effects of the last can be determined (3,4). Vasodilatation depending on the endothelium can be produced by acetylcholine and is mediated mainly by a combination of the effects of nitric oxide (N.O.), prostaciclines, and local hyperpolarization factors that work together to reduce the tonus of the vascular smooth muscle.

Measuring the blood flow vasodilatation depending on the endothelium through high resolution ultrasound at the level of brachial artery is imperative as a predictive long term method in regarding the endothelium vasomotor modification and it can be extended as a method of appreciating the vascular dysfunction of the coronaries. Lowering of the vasodilatation mediated by blood flow was found since the age of 3 months in infants with low birth weight (5) without knowing for sure if these changes can be correlated with the appearance of late metabolic disorders or if they are produced by intrinsic vascular abnormalities. In children between the age of 9 and 11 years the accepted risk factors of atherosclerosis can affect the arterial distension at the brachial artery level being in a reverse correlation with the level of cholesterol, LDL and apolipoprotein B even in this stage of their lives (6). In a study developed on obese children, Meyer et al. (4) recognized a significant lowering of the vasodilatation mediated by the blood flow, the increased average thickness of the intima , concomitant with the modifications of selectine, trombomoduline and other parameters of the lipids' metabolism (table I).

Experimental research has shown that pregnant rat females that were fed with a diet containing 50% normal calories had descendants which at the age of 3 months had low aortic vasodilatation at acetylcholine and low expression of the gene for endothelial NO synthetase and low activity

TABLE I

Somatic, cardiovascular and lab parameters in obese children in comparison with the control group (Meyer et al, 2007)

Variables	Obese (n= 32, average values)	Control (n= 20, average values),	P
Age	13.7	14.7	
Masc/fem	15/17	8/12	
BMI (kg/m2)	30.6	20.4	< 0.001
Body fat	36.5%	22%	<0.001
sBP	125 +/- 15	123 +/- 9	
sBP at effort	170 +/- 28	143 +/- 16	< 0.001
Insulin pmol/l	13.6	8	< 0.002
Rezistance to insulin	3.86	2.2	
LDL/HDL	2.46	1.8	
Fibrinogen g/l	3.5	2.5	< 0.001
Flow mediated vasodilatation	5.8	9.29	< 0.001
Average thickness of the carotide	0.49	0.39	< 0.001
von Willebrand Factor %	120	110	
E-selectina ng/ml	41.1	31.3	
Trombomoduline ng/ml	35.7	29.9	

of the enzyme (7).

Similar results were obtained in the case of periconception maternal proteic restriction both in rat and sheep offsprings. The causes of the disorders occurring in the endotherial cells are due to the modifications in the homocystein metabolism and the changes in the D.N.A. methylation, these having as a consequence some disorders in the embryonic vasculogenesis (8). The essence of the modifications in the vascular tonus of the experience animals' offsprings which had a low input of proteins, calories or had been fed with an excess of fats are characterized by endotherial dysfunction and it associates with the resistance to insulin and diabetes mellitus type 2.

THE DETECTION OF MORPHOLOGIC MODIFICATIONS OF THE ARTERY WALL

The average thickness of the intima measured by ultrasound at the level of the carotide artery or the aorta serves as a marker in the development of atherosclerotic processes by evidentiating the severity of the extension of the disease (8,9). In a study carried out along three years on 280 patients through coronary angiography, Crouse et al. (10) have stated that the subjects which had coronary artery disease developed the thickening of the artery walls at the level of the coronary arteries at a rate 3 times faster than in the ones without coronary modifications. Davis et al. (11) have examined the predictive value of the risk factors, investigated since childhood in 725 adults between the age of 33 and 42 years, and the result was that the most important are LDL, HDL cholesterol, diastolic blood pressure for the male subjects and LDL, BMI and the level of triglycerides for the female subjects. By following in time the cohorts Bogalusa has shown that the level of LDL cholesterol and the BMI correlate with the average thickness of the carotidian wall in adults (12). In premature neonates or dismatures a significant growth in the thickness of the aortic wall was stated in comparison to the values found in term neonates (table II).

Nowadays it is clear that the vascular endothelium is a key factor in the development of cardiovascular diseases. The diminishment of its functions was correlated with accelerated atherosclerosis, the development of high blood pressure and the glucose intolerance (6).

The early structural changes in the artery walls can have as a cause the metabolic disorders conditioned by endocrine glands both being in extension during evolution. Some data suggest that among the first detectable modifications are those in the lipid metabolism meaning that high values of triglicerides are found in the group of neonates with low birth weight (table III).

Prematurity and dismaturity can be considered predictive elements for cardiovascular and metabolic pathology at the adult age.

TABLE II

Modification in the thickness of the aortic wall in prematures, dismatures comparative with normal weight neonates

Authors	Maximum thickness in the aortic wall in the group with intrauterine growth restriction	Maximum thickness of the aortic wall at neonates with normal birth weight	Statistic significance
Skilton et al 2005 (13)	0,30 mm/Kg	0,199 mm/Kg	P <0,0001
Koklu et al 2006 (14)	0,23 +/- 0,03 mm/Kg	0,12 +/- 0,02 mm/Kg	P < 0,0001

TABLE III

Modifications of the plasma lipids parameters in prematures and term neonates

Authors	Lipids parameters	Group with intrauterine growth restriction mg/dl	Neonates with normal weight mg/dl	Statistic significance
Koklu et al 2006 (14)	Trygliceride	48,9 +/- 14,8	32,5 +/- 9,8	P < 0,0001
Molina et al 2000 (15)	Trygliceride	45 +/- 27	36 +/- 19	P < 0,001
Kozuchowska 2003 (16)	Plasma lipids in the umbilical cord	High values for: TG total cholesterol, VLDL, apolipoproteine Low values for HDL		Without significant statistic differences

TABLE IV

The prevalence of fibrose plates in the aorta and the coronary arteries in 204 children and young adults according with age

Age in years	Aorta	Coronary arteries
2-15	20%	7%
16-20	14%	37%
21-25	33%	55%
26-39	60%	67%

EVIDENCE OF EARLY ATHEROSCLEROTIC LESIONS

The evidence of atherosclerotic lesions in the arterial wall of children with different ages and in young people is an ordinary finding (1,9,17) (table IV).

The presence of the risk factors and the period of their action influence the appearance and the progression of the vascular lesions. In the Bogalusa study early correction of multiple risk factors was correlated with the data obtained during autopsy. Considering BMI, systolic and diastolic blood pressure, plasma concentration of triglicerides, LDL, HDL cholesterol as major risk factors alone or in association, it has been found that they raise progressively the extension of atherosclerotic lesions in children and young adults deceased by extracardiac injuries (17). Studying thoroughly the investigations through noninvasive methods concerning the atherosclerotic pro-

TABLE V

Correlations between weight at birth, the evolution of blood pressure and the cardiac risks as being found in population studies

Authors/year	Place/period of the study	Number of subjects	Results/discussions
Barker et al. 1995 (18)	England, born between 1911-1930	16.000	The rate of deaths by ischemic cardiophaty (IC) at neonates under 2500 g is 3 times higher when they reach the adult age; there are associations with low tolerance to glucose, high blood pressure and disorders in the lipids metabolism
Leon et al. 1998 (19)	Sweden, born between 1915-1929	14.611	The adults' mortality through IC rises proportionally with low weight at birth. Reducing the rate of fetal growth is the main factor of mortality trough IC. Artifacts of selection or social economic factors can't explain this association.
Eriksson et al. 2001 (20)	Finland, born between 1934-1944	4630	The risk factors for IC: low weight at birth, small height at 1 year of age. The risk rate has diminished progressively from 1,83 in male subjects with BMI under 16 kg/m^2 to 1 at those with BMI under 19 kg/m^2
Leon et al. 2000 (19)	Sweden, born between 1973-1976	165.136	At the age 18 years the systolic blood pressure is in a reverse correlation with birth weight for gestational age
Barker et al. (21)	Finland, born between 1924-1944	13.517	There is a correlation between low birth weights, low weight in the infant period followed by accelerated growth between 3 and 11 years of age and the risk factors for coronary disease, diabetes mellitus type 2 and high blood pressure.

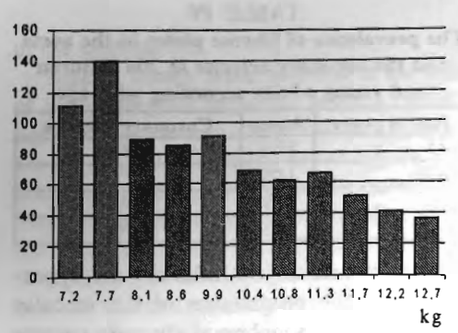


Fig. 1. The correlation between the weight at 1 year of age and the standard rate of coronary disease mortality in 16000 male adults (18). IC= ischemic cardiopathy, BMI= body mass index

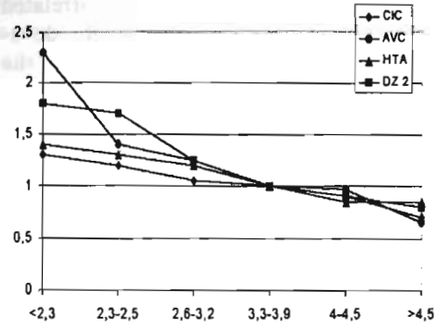


Fig. 2. Reverse correlation between birth weight and cardiovascular disease and diabetes mellitus type 2 found in a health study developed on nurses from the USA, on 66111 female subjects (22)

gression led to conclusions that showed an early deposit of lipids in the arterial wall.

Epidemiologic and experimental data concerning the modifications that leads to atherosclerosis

Nowadays, the concept that at the origin of cardiovascular diseases and metabolic syndrome there lie the eating habits and sedentariness of western society is wide spread. Barker's retrospective epidemiologic studies and those of other researches (18,19,20,21) developed on large cohorts of subjects between 45 and 60 years of age suffering or deceased because of cardiovascular disease, have shown a correlation between having the disease and low birth weight (table V, fig. 1).

These findings were confirmed by big population studies done on female subjects in the USA (fig. 2).

In the essence the fetal origin hypothesis considers that the fetal nutrition deficits produce restriction in the development of some internal organs (the pancreas, the kidneys, the liver, the heart) and endocrine disorders in critical periods of their development during gestation. The most important consequence is that the metabolism sets for an economic consumption in fetal life, programming which is maintained for the rest of the life (metabolic imprinting). Intrauterine growth restriction which has as a most frequent expression the low birth weight is not followed by pathological events if the food restriction continues along their existence. But if the alimentary diet becomes rich, based on high amount of lipids and carbohydrates the somatic and metabolic consequences would appear. Although low weight at birth doesn't produce obesity, it represents a risk factor together with gestational diabetes, the obesity of the mother and the infant's overfeeding (23,33). The main characteristic of the thin phenotype ("the surviving phenotype") is the resistance to insulin together with diminished muscle mass, central deposits of lipids, modifications in the pituitary-adrenal pathway and some comportmental particularities (restriction of physical activity, modifications in the appetite/some food preferences)(24).

Studies carried out in Romania (25) identify low birth weight as a possible cause of adults' high mortality rates through cardiovascular and cerebrovascular diseases. Thus Romania is situated on the second place in Europe regarding the high incidence of birth weights under 2500 g, on the seventh place for place for deaths through cerebrovascular disease and among the first places in deaths caused by cardiovascular disease. In a study developed on

TABLE VI

The effect of the palmitate over the secretion of insulin in the pancreatic islands at rat offsprings born from mothers that were fed in exces with carbohidrates

Glucose Mm	Income	Insulin secretion fmol/ 20 islands/60 min	Insulin secretion fmol/ 20 islands/60 min *
		Natural feeding	Feeding with excess of carbohydrates
5,5	Without	1.95 +/- 0.02	3.71 +/- 0.18
5.5	Na Palmitate 125uM	1.95 +/- 0.05	6.68 +/- 0.15 (p< 0.05)
5.5	Na Palmitate 250 uM	2.03 +/- 0.03	11.33 +/- 0.49 (p< 0.05)

* fmol = fentomol; fento = 10^{-15}

2026 teenagers from the Philippines, Adair et al. (26) it has been stated that the highest value of blood pressure for boys between 14 and 16 years of age were found in the low birth weight group, which were now overweight. Values higher than normal with 3-5 mm Hg at this age are considered predictive for developing high blood pressure later. In our study developed on 135 children born between 1981 and 1986 from the countryside of the Braşov county, we found that at teenage the former prematures had a high BMI, abundent fat deposits, atherogen lipids' profile compared with the witness group (27). Although some of the differences were not of statistic significance, they all led to the homogeneous tendency of the group to evolve towards metabolic pathology.

Using an experimental model, Vikers et al. (28) showed that intrauterine subnutrition of rat offsprings is followed after ceasing the breast feeding, in overfeeding conditions, by high systolic blood presure, high values of plasmatic insulin and leptine and clinically speaking overeating and obesity. If the pregnant animals received food rich in carbohidrates, after ceasing, the offsprings presented hyperinsulinemia, hyperglicemia, an accelerated gain of weight (29). The transfer of the resistance to insulin phenotype to the offsprings is acompanied by metabolic modification among which it is mentioned the hypersecretion of insulin produced by the presence of free fatty acids (table VI). The study underlined the protective effect of the natural feeding over the metabolic homeostasis.

EPIGENETIC CONCEPT OF ATHEROSCLEROSIS

Epigenetics represents the study of the changes found in the expression of the genes that are produced without modifications in the DNA sequence. Taking into consideration the biochemical environment in which each molecule of DNA lies, these environments decide if the genes will be stimulated or inhibited. In the first case they will pass the transcription process and afterwards they will follow the synthesis of the proteins needed for the well functioning of the body. The inhibited genes will remain inactive until the functional necessities will reintroduce them in the activating mechanism. All body tissues posses the same genetic heritage formed of 30000 genes; according to the epigenetic code only a small part of them are expressed having as a result a certain phenotype. The epigenetic code is determined by other connected and interdependent codes (the code of DNA methylation, the hystones code, the co regulation code). By their action they adapt the chromatine so that the transcriptional factors can act on the genes that will be expressed. The result of this regulation can be manifested as a characteristic that can be transmitted from a generation to another. Some transient nutritional stimuli acting in the critical period of orthogenic development can influence the long term expression of different genes through modifica-

tions of the chromatine outlay and the accessibility of the transcriptional factors (45). During orthogenics the cells depend on the external signals coming from nutritional substances and their metabolites, the concentration of oxygen, endocrine stimuli, which in their totality decide by the epigenetic mechanism the way in which the tissues and organs develop.

The disorder in the epigenetic mechanism as an origin of some major diseases (cancer, chromosomal disease, mental retardation) was implicated recently in producing the dismetabolic syndrome and atherosclerosis (30). The changes in the DNA methylation induce the expression of some genes and the synthesis of some proteic molecules which govern in association with some polymorphisms implying a single nucleotide and they can explain the basic disorders of the atherosclerotic disease.

FROM GENES TO VASCULAR DISEASE

Atherosclerosis is mainly a disease of large arterial vessels. A logical question refers to the correlation between the circulatory sector (for example high values of plasma cholesterol) and the specific lesions of the vascular wall. It is considered that areas with increased blood flow are the first exposed to modification of the vascular endothelium. The transformations in these areas affect the vascular contraction smooth muscle cells that become active, proliferative and non contractile (26,31). The differences in the genes' expressions in the arterial endothelial cells and those of venous origin in cell cultures show that (26):

- arterial endothelium in the presence of LDL and proinflamatory citokines stimulate the synthesis of cell adhesion molecules and of the genes implicated in proliferation and apoptosis
- the venous endothelium in the presence of LDL and inflammation mediators express the genes that inhibit the free oxygenated radicals and they diminish the inflammation, they are thus implicated in vascular protection.

After Chi et al. (32) the stage studies permit the following comments: (a) the delimitation of a number a genes expressed in the vascular endothelium implicated in the process of atherosclerosis, (b) the different expression of proliferating genes in the arterial and venous endothelium, (c) the existence of cellular subtypes and specific different mediators as an answer to atherosclerotic stimuli.

In all vascular samples taken from patients with atherosclerosis (done during vascular surgical procedures) the methylation of ER alpha gene (the gene of estrogen receptor) was evidentiated at the level of the arterial endothelium (31). It is well known that the ER alpha receptor through activation by estrogen regulates a variety of cellular activities like inhibiting the cell proliferation for tumor cells or for the vascular endothelium. Due to ER alpha receptor's activity and because of the cardiac protection offered by estrogens, the incidence of atherosclerosis is low in women before menopause and rises significantly afterwards. By the methylation of ER alpha gene during the aging process the protecting effect of estrogen disappears, demonstrating thus how important the methylation process is for atherosclerosis. Disorders in the methylation of DNA either by hypomethylation but also by hypermethylation and the advanced stages of the disease are common both to atherosclerosis but also to several forms of cancer. It is remarkable that the pattern of methylation is modified before the vascular lesion appears (2).

FINAL STATEMENTS

From the presented data a lot of evidence has been developed stating that the atherosclerotic process starts early in the

course of life. Among the highest risk factors are situated the errors of fetal metabolism planning followed by those added by the environment through nutrition and lifestyle. On a molecular level the real cause of atherogenesis could be the epigenetic transmission of the expression of some genes due to modifications in the DNA methylation. The children whose mothers had high values of plasma cholesterol during pregnancy present a higher progression rate of atherosclerosis in comparison with those born from mothers with normal metabolic parameters. Even though the placenta is impermeable for the LDL particles the final peroxydation products of the lipids can cross it and in their turn they produce modifications in the expression of the arterial muscle genes that persists a long time (9). What's more, in the cases of dismetabolic syndrome in children/teenagers the severe manifestations of atherosclerosis can appear early, starting with 20 years of age. The key between the age progression and atherosclerosis appears to be in the DNA gene methylation. In cultures of miocardic muscle cells obtained from deceased subjects the infants' rate of methylation in ER alpha gene was of 19 % towards 99 % in adults (31). Knowing in detail the 3 major pathways in the construction of the phenotype : the genetic mechanism, the epigenetic control in the expression of genes and maternal imprinting will have a big contribution to the integrative knowledgement of pathology in the individual's biological cycle.

REFERENCES

1. McMillen C, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85. 571-633.
2. Lund G, Andersson L, Lauria M et al. DNA methylation polymophisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem* 2004; 279: 29147-29154.
3. Halcox JP, Deanfield JE Childhood origins of endotelial dysfunction. *Heart* 2005; 91: 1272-1274.
4. Meyer AA, Jundt G, Steiner M, Schuff-Werner P, Kienast W. Impaired flow-mediated vasodilation, carotid artery intima-media thickening, and elevated endothelial plasma markers in obese children: the impact of cardiovascular risk factors. *Pediatrics* 2006; 117 (5): 1560-1567.
5. Goh KL, Shore AC, Quinn M, Rooke JE. Impaired microvascular vasodilatory function in 3-month-old infants of low birth weight. *Diabetes Care* 2001; 24: 1102-1107.
6. Leeson CMP, Whincup PH, Cook DG. Cholesterol and arterial distensibility in the first decade of life: a population-based study. *Circulation* 2000; 101: 1533-1538.
7. Franco MD, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 145-153.
8. Steegers-Theunissen RP, Steegers EA. Nutrient-gene interactions in early pregnancy: a vascular hypothesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 106: 115-117.
9. Celermajer DS, Ayer JGJ. Childhood risk for adult cardiovascular disease and primary prevention in childhood. *Heart* 2006; 92: 1701-1706.
10. Crouse JR, Tang R, Espeland MA, Tery JG, Morgan T, Mercuri M. Associations of extracranial carotid atherosclerosis progression with coronary status and risk factors in patients with and without coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106 (16): 2061-2066.
11. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Lauer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured form chidhood through middle age: the Muscatine Study. *Circulation* 2001; 104: 2815-2819.
12. Li S, Chen W, Srinivasan SR. Childhood cardiovascular risk factors and carotid changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *JAMA* 2003; 290: 2271-2276.

13. Skilton MR, Evans N, Griffiths KA, Celermajer DS. Aortic wall thickness in newborns with intrauterine growth restriction. *Lancet* 2005; 365 (9469): 1484-1486.
14. Koklu E, Kurtoglu S, Akcakus M et al. Increased aortic intima-media thickness is related to lipid profile in newborns with intrauterine growth restriction. *Horm Res* 2006; 65 (6): 269-275.
15. Molina M, Casanueva V, Cid X et al. Lipid profile in newborns with intrauterine growth retardation. *Rev Med Chil* 2000; 128 (7): 741-748.
16. Kozuchowska PE. The concentration of lipids, lipoproteins and apolipoproteins in cord blood serum of newborns in the course of intrauterine period. *Ann Univ M Curie Sklodowska* 2003; 58 (2): 25-32.
17. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *N Engl J Med* 1998; 338 (23): 1650-1656.
18. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995; 311: 171-174.
19. Leon DA, Lithell HO, Vagero D, Koupilova I, Mohsen R, Berglund L. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischemic heart disease: cohort study of 15.000 Swedish men and women born 1915-1929. *BMJ* 1998; 317 (7153): 241-245.
20. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 1999; 318 (7181): 427-431.
21. Barker DJP. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58: 114-115.
22. Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, Stampfer MJ, Manson JE. Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ* 2005; 330: 1115.
23. Gluckman PD, Hanson MA. Metabolic disease: evolutionary, developmental and transgenerational influences. In: Hornstra G, Uauy R, Yang X editors. *The Impact of Maternal Nutrition on the Offspring. Nestle Nutr Ped Prog* 2005; 55: 17-27.
24. Gluckman PD, Hanson MA. Adult disease: echoes of the past. *Eur J Endocrinol* 2006; 155 (1): S47-S50.
25. Ionescu T, Ursuleanu D, Ursuleanu I. *Starea de sănătate la naştere şi până la vârsta de 1 an. Posibile legături cu unele boli cronice la vârsta adultă.* Ministerul Sănătăţii, Centrul de Statistică Sanitară Bucureşti, 2004.
26. Aird WC. Mechanisms of endothelial cell heterogenity in health and disease. *Circ Res* 2006; 98: 159.
27. Buzinschi S. Determinanţi nutriţionali şi epigenetici ai obezităţii. *Rev Med Chir* 2006; 110 (3): S26-S32.
28. Vikers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hohman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E83-E87.
29. Patel MS, Srinivasan M, Laychock SG. Nutrient-induced maternal hyperinsulinemia and metabolic programming in the progeny. In: Hornstra G, Uauy R, Yang X editors. *The Impact of Maternal Nutrition on the Offspring. Nestle Nutr Ped Prog* 2005; 55: 137-151
30. Gallou-Kabani C, Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. *Diabetes* 2005; 54 (7): 1899-1906.
31. Dong C, Yoon W, Goldschmidt-Clermont PJ. DNA methylation and atherosclerosis. J Nutr, 2002, 132, 2406S-2409S
32. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10623-10628.
33. Bavdekar A, Yajnik CS, Fall CHD. The insulin resistance syndrome in eight-year-old Indian children: small at birth, big at eight years, or both? *Diabetes* 1999; 48: 2422-2429.
34. Cole TJ, Adair LS. Rapid child growth raises blood pressure in adolescent boys who were thin at birth. *Hypertension* 2003; 41: 451.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

CANCERUL MAMAR TRIPLU NEGATIV - SPRE O NOUĂ ENTITATE

L. Miron[1], Andreea Marinca[2], M. Marinca[1], Ingrith Miron[3]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Disciplina de Oncologie
3 Clinica a IV-a Pediatrie
Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţe "Sf. Spiridon" Iaşi
2 Clinica Oncologie-Radioterapie

TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER - TOWARDS A NEW ENTITY (Abstract): Breast cancer is considered today as a heterogeneous group of diseases, with a wide spectrum of clinical, pathologic and molecular features. A new classification of breast carcinomas, based on gene expression profiles technologies (cDNA microarray), shows impact on the diagnosis and prognostic classification of tumors, prediction of response of individual patients to specific chemotherapeutic regimens, and identification of novel tumor targets. **Aim**: To identify the proportion of basal-like ("triple-negative") tumors in patients treated for breast carcinoma. **Objectives**: To evaluate the impact of molecular subtyping on treatment response, disease-free survival and overall survival of patients, and to establish and correlate particular biologic, clinical and diagnostic features of these cancers. Methods: 96 patients with breast cancer, aged 28-78 years, were retrospectively selected using specific criteria from cases treated between 2001 and 2007 in the Oncology Department of the "Sf. Spiridon" Hospital Iaşi. Tumors were divided into molecular subtypes using immunohistochemistry data. **Results**: The most frequent pathology was ductal carcinoma (77 patients, 80.2%), and most tumors were intermediately or poorly differentiated (G2 43 patients, 44.8%; G3 37 patients, 38.5%) The proportion of basal-like tumors in the population sample analyzed was 15.62% (15 patients). Histological type ($p=0.85$), pTNM stage ($p=0.618$), and tumor differentiation grading ($p=0.54$) did not correlate with molecular subtype. Patients with basal-like tumors had lower time-to-progression (mean 31.2 months, 95%CI 18.5-43.8, $p=0.005$), disease free survival (mean 24.46 months, 95%CI 12.6-36.3, $p=0.016$), and overall survival (mean 39.26 months, 95%CI 26.7-51.7, $p=0.023$). **Conclusion**: We have demonstrated, using the simple commonly available immunohistochemical markers ER, PR and HER2/*neu*, that patients with triple negative breast cancers have relatively poor prognosis, with significantly shorter survival and a poorer response to standard treatment strategies. **Key words**: BREAST CANCER, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, MOLECULAR CLASSIFICATION, BASAL-LIKE

Evoluţia cancerului mamar uman a fost ameliorată spectaculos în ultimii 10 ani de progresele noilor terapii sistemice şi de aplicarea programelor de screening (1).

Cancerul mamar are originea în reţeaua canaliculară ductală glandulară care se termină în unitatea lobulară glandulară - numită *unitatea terminală ducto-lobulară* (UTDL) - compusă din două straturi de celule epiteliale: stratul intern polarizat epitelial, numit *luminal*, şi stratul extern (*bazal*), al celulelor mioepiteliale. Conform clasificării OMS, cancerele mamare exprimă o varietate largă de tipuri morfologice şi histopatologice specifice (mai mult de 20), unele dintre acestea cu trăsături clinice şi

prognostice particulare (tipurile: ductal, lobular, tubular, medular). În contextul acestei clasificări, se presupune că majoritatea cancerelor mamare derivă din celulele luminale ale UTDL(2).

Sistemul de clasificare molecular al tumorilor mamare, aşa cum a fost propus iniţial de Perou et al. (2000) şi Sorlie et al. (2001), se bazează pe microstudiul profilului genetic, însă o metodă simplificată de clasificare bazată pe studiul markerilor tumorali (receptorii estrogeni, progesteronici şi HER2/*neu*) pare a fi suficient de fiabilă (şi oricum mai fezabilă şi rapidă), pentru a fi utilizată curent în clinică (3).

Recent, o nouă clasificare moleculară a cancerului mamar a fost propusă pe baza studiului profilului expresiei genice şi al ARNm extras din tumoră, prin tehnologia *microarray*. Deşi numărul subtipurilor moleculare de cancer mamar nu este încă cert, au fost definite actual trei entităţi principale (luminal, bazal-*like* şi HER-2/*neu* pozitive), ale căror trăsături clinico-biologice şi terapeutice au fost parţial identificate (4).

Subtipurile luminale (A şi B) sunt caracterizate prin expresia receptorilor estrogenici (RE), a altor gene în relaţia cu RE şi a celor de sinteză a cheratinelor exprimate de celulele luminale, particular, tipul citokeratină-8 (CK8); pe de altă parte, receptorul pentru factorul de creştere epidermal (EGFR), subunitatea HER-2/*neu* (c-erbB2), nu este exprimat în mare parte dintre tumorile care fac parte din acest subtip (varianta B).

În contrast, tumorile bazal-*like* sunt RE-negative şi HER-2/*neu* negative („triplu negative") şi exprimă citokeratine ale celulelor epiteliale bazale: CK5/6, CK14 şi CK17 (5).

Carcinoamele mamare HER-2/*neu* pozitive, aşa cum sunt definite cu ajutorul tehnologiei *microarray*, se caracterizează nu numai prin expresia crescută a HER-2/*neu*, dar şi prin statusul negativ al RE (expresia scăzută a RE şi a genelor în relaţie cu aceştia)(6).

Cu toate acestea, provocarea majoră pentru anatomo-patologi rămâne reconcilierea clasificării morfologice clasice cu noua clasificare moleculară, precum şi identificarea altor factori prognostici, câtă vreme nu există markeri imunohistochimici pentru a desemna tipul molecular al unui caz nou de cancer mamar (7).

OBIECTIVE

Studiul actual şi-a propus evaluarea trăsăturilor clinico-biologice şi imagistice a subtipului de cancer mamar numit triplu negative privind:

- aspecte clinico-epidemilogice ale acestui subgrup;
- timpul până la progresie a bolii;
- intervalul liber de boală;
- supravieţuirea generală a acestor paciente.

MATERIAL ŞI METODĂ

În studiul actual, s-a evaluat retrospectiv un număr de 95 de paciente dintre cele 486 tratate pentru neoplasme mamare în Clinica de Oncologie a Spitalului Clinic Judeţean de Urgenţe „Sf. Spiridon" Iaşi în perioada2001-2007, pentru care au fost disponibile date cu privire la statusul RE, RP şi HER-2/*neu*, precum şi date complete de urmărire.

Datele asupra statusului RE, receptorilor progesteronici (RP) şi HER-2/*neu* pentru pacientele care au fost incluse în studiu au fost obţinute din ţesutul tumoral conservat la parafină prin tehnici standard. S-a utilizat analiza imunohistochimică pentru RE şi RP, şi respectiv testul HercepTest (Dako) pentru HER-2/*neu*.

Pentru RE şi RP, pozivitatea a fost afirmată pe baza evidenţierii acestora, în nucleul şi citoplasma a cel puţin 10% dintre celulele tumorale, în acord cu ghidurile standard.

Datele asupra statusului HER-2/*neu* au

fost obţinute prin intermediul coloraţiei imunohistochimice în membrana celulară (şi ocazional în citoplasma celulelor tumorale), gradate după o scală semicantitativă. Scorurile 0 şi 1+ au fost considerate negative, scorul 3+ a fost considerat pozitive iar scorurile 2+ au fost considerate pozitive sau negative (cu includerea pacientelor în studiu) doar dacă a fost disponibil rezultatul tehnicii de hibridizare prin fluorescenţă *in situ* (FISH).

Scopul studiului a constat în descrierea aspectelor clinico-epidemiologice ale acestui grup de paciente oncologice, identificarea subtipului triplu negativ (bazal-*like*) de cancer mamar, stabilirea semnificaţiei prognostice şi predictive a tipului de tratament utilizat, stabilirea unor trăsături clinico-biologice şi imagistice pentru a valida utilitatea prognostică a noii clasificări şi pentru a determina dacă cancerele mamare triplu negative prezintă un comportament mai agresiv, evaluat în termenii ratelor de răspuns la tratament, timpului până la progresie sau supravieţuirii fără boală după tratament, şi ai supravieţuirii generale.

Pentru prelucrarea statistică a datelor s-a utilizat soft-ul SPSS v13.0. Pentru variabilele luate în studiu a fost aplicat testul Chi-square (χ^2) şi s-au calculat formulele de corelare direcţională (lambda, Goodman şi Kruskal tau, coeficientul de incertitudine) şi simetrică (Phi, Cramer's V, Pearson's R, Spearman). Timpul până la progresie, supravieţuirea fără boală şi supravieţuirea generală au fost exprimate ca valoare medie şi mediană (interval de confidenţă 95%), iar corelaţiile subtipurilor histologice cu acestea au fost evidenţiate şi ilustrate prin metoda Kaplan-Meier. Comparaţia a fost cuantificată prin valoarea *p* (considerată semnificativă la valori <0.05), cu ajutorul testelor log-rank (Mantel-Cox) şi Breslow (generalized Wilcoxon).

REZULTATE

Pe baza testelor clinice ale celor 96 de paciente cu cancer mamar au fost identificate ca aparţinând subtipului triplu negativ un număr de 15 paciente, ceea ce reprezintă 15.62% din întregul lot. Au fost analizate aspectele legate de vârsta la prezentare, prezenţa factorilor de risc fiziologici pentru cancerul mamar, instalarea menopauzei, afecţiunile asociate semnificative, stadializarea bolii (clinică şi anatomo-patologică), numărul ganglionilor limfatici axilari cu metastaze, tratamentul urmat (tip, secvenţă, modalităţi terapeutice).

Caracteristicile pacientelor sunt prezentate în detaliu în tabelul II.

Vârsta medie la momentul diagnosticului a fost de 51,5 ani (limite 28-78 ani). Una dintre diferenţele cele mai evidente

TABELUL I

Codificarea statusului receptorilor hormonali şi al HER-2/*neu* în celulele tumorale mamare

Receptor	Caracteristici de colorare		Scor	Interpretare
RE, RP	Nucleară	0-10% din celule	–	Negativ
		10-30% din celule	+	Pozitiv
		30-70% din celule	++	Pozitiv
		70-90% din celule	+++	Pozitiv
	Citoplasmatică	Negativă	–	Negativ
		Intermediară	+	Pozitiv
		Crescută	++	Pozitiv
EGFR (HER-2/*neu*)	Fără coloraţie membranară		0	Negativ
	Coloraţie uşoară în 10% din celule		1+	Negativ
	Coloraţie incompletă / moderată		2+	Negativ / Pozitiv
	Coloraţie intensă / completă		3+	Pozitiv

TABELUL II
Caracteristicile lotului de studiu

				n	%
Factori de risc fiziologici			Nu	80	83.3%
			Da	16	16.7%
Status menopauzal			Nu	38	39.6%
			Da	58	60.4%
Comorbidităţi			Nu	66	68.8%
			Da	30	31.3%
Stadiul histologic (pTNM)			Stadiul 0	1	1.0%
			Stadiul I	8	8.3%
			Stadiul II	31	32.3%
			Stadiul III	50	52.0%
			Stadiul IV	6	6.3%
Nr. ganglionilor invadaţi			? 3	57	59.4%
			4 - 10	32	33.3%
			11 - 45	7	7.3%
CHT primară	Nu	*RT primară*	Nu	69	71.9%
			Da	0	.0%
	Antracicline	*RT primară*	Nu	2	2.1%
			Da	2	2.1%
	Non-antracicline	*RT primară*	Nu	21	21.9%
			Da	2	2.1%
Chirurgie	Intervenţie conservatorie			21	21.9%
	Mastectomie radicală			70	72.9%
	Nu			3	3.1%
	Mastectomie „de toaletă"			2	2.1%
CHT adjuvantă	Nu	*RT adjuvantă*	Nu	13	13.5%
			Da	11	11.5%
	Non-antracicline, non-taxani	*RT adjuvantă*	Nu	4	4.2%
			Da	11	11.5%
	Antracicline	*RT adjuvantă*	Nu	17	17.7%
			Da	37	38.5%
	Taxani	*RT adjuvantă*	Nu	0	.0%
			Da	1	1.0%
	Antracicline + taxani	*RT adjuvantă*	Nu	0	.0%
			Da	2	2.1%
HT adjuvantă	Nu	*Ablaţia/supresia ovariană*	Nu	34	35.4%
			Da	1	1.0%
	Tamoxifen	*Ablaţia/supresia ovariană*	Nu	40	41.7%
			Da	21	21.9%
	IA	*Ablaţia/supresia ovariană*	Nu	0	.0%
			Da	0	.0%

între subgrupul pacientelor cu cancere triplu negative faţă de cele non-bazal-*like* este procentul mai mare de femei de vârstă tânără, cu numai 37% din cazuri de vârstă peste 50 de ani.

Nu au fost semnalate particularităţi în privinţa statusului menopauzal al pacientelor sau a comorbidităţilor, aceste elemente nefiind corelate statistic cu subtipul biologic (p=0,522).

Cu privire la stadializarea tumorii la momentul diagnosticului, se observă că cea

mai mare parte a cazurilor triplu negative se prezintă în stadii local-avansate (IIB 16,7%, IIIA 13,5% şi IIIB 21,9%). Stadiul clinic (cTNM) şi cel anatomo-patologic (pTNM) al neoplaziei mamare nu au fost corelate însă statistic semnificativ cu subtipul tumoral biologic (p=0.618).

Pentru marea majoritate a cancerelor mamare studiate a fost disponibil diagnosticul anatomo-patologic, fiind descrise următoarele forme histologice: carcinom ductal, 77 paciente (80,2%); carcinom lobular, 3 paciente (3,1%); carcinom papilar, 4 paciente (4,2%); carcinom medular, 5 paciente (5,2%); histologie neprecizată, 2 paciente (2,0%).

Distribuţia în funcţie de subtipul histologic nu a demonstrat o diferenţă în grupul de carcinoame non-triplu negative faţă de celelalte clase moleculare.

Distribuţia cazuisticii în funcţie de statusul receptorilor estrogenici (RE), progesteronici (RP) şi HER-2/*neu* a fost relativ uniformă, aceştia fiind pozitivi în 66, 63 şi respectiv 55 de cazuri, după criteriile de încadrare stabilite.

Analiza gradului de diferenţiere tumorală (G) a indicat următoarea distribuţie: tumori G1 7 paciente (7,3%), G2 - 43 paciente (44.8%), G3 - 37 paciente (38,5%); informaţiile privind grading-ul histologic nu au fost disponibile în 9 cazuri (9,4%). Gradul de diferenţiere tumorală nu s-a corelat statistic semnificativ cu subtipul molecular (p=0,54), totuşi, tumorile cu un grad de diferenţiere scăzut (G3) au fost mai frecvent întâlnite decât cele de grad mare/intermediar (G1/G2) în subtipul de tumori mamare bazal-*like*, prin contrast cu subtipurile luminale şi HER-2/*neu* pozitiv.

Analiza prin metoda Kaplan-Meier şi prezentarea grafică a curbelor de supravieţuire a condus la identificarea a două subgrupe de paciente cu prognostic distinct: tipurile luminal A şi luminal B, care prezintă o evoluţie mai favorabilă faţă de subgrupul pacientelor clasificate ca HER-2/*neu* şi al celor cu tumori triplu negative, cu o medie de supravieţuire fără boală (*disease-free survival*, DFS) mai redusă (56 şi respectiv 63 luni, *vs.* 42 şi respectiv 39 luni, p=0,016). De asemenea, la pacientele cu cancere mamare luminale s-a înregistrat un timp până la progresia bolii (*time-to-progression*, TTP) semnificativ mai lung decât în subgrupul pacientelor cu tumori încadrate în tipul bazal-*like* (46 şi respectiv 52 luni, *vs.* 34 şi 31 luni, p=0,005) (tab. III).

În general, subtipurile luminal A şi B prezintă un prognostic semnificativ mai bun, în timp ce subtipul HER-2 pozitiv şi în special cel triplu negativ prezintă un prognostic nefavorabil în termenii supravieţuirii medii generale (56,4 şi respectiv 63,0 luni,

TABELUL III
Valorile medii ale timpului până la progresie şi supravieţuirii fără boală a pacientelor în funcţie de clasificarea moleculară a tumorilor mamare

Subtip biologic	Valoare medie (luni)					
			Interval de confidenţă 95%			
	TTP	*DFS*	*Limita inferioară*		*Limita superioară*	
			TTP	*DFS*	*TTP*	*DFS*
Bazal-*like*	31.2	24.4	18.5	12.6	43.8	36.3
Luminal A	46.8	41.5	39.2	32.0	54.3	51.1
Luminal B	52.9	44.9	45.8	36.8	59.9	53.0
HER-2/*neu*+	34.9	33.1	21.7	19.7	48.0	46.5
Generală	45.0	38.9	40.2	33.7	49.8	44.2

TTP, time-to-progression; DFS, disease-free survival

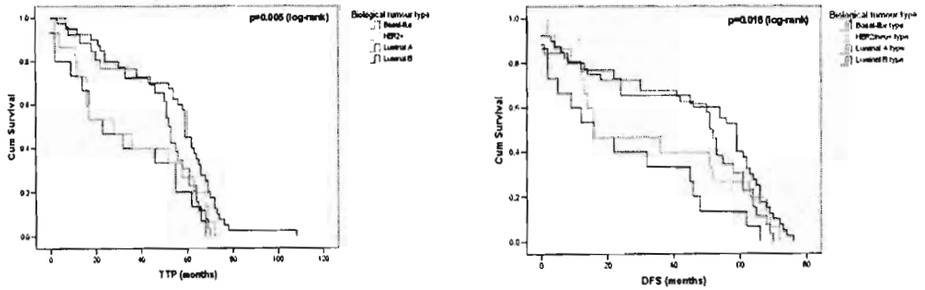


Fig. 1. Analiza Kaplan-Meier a curbelor intervalului până la progresie şi a supravieţuirii fără boală

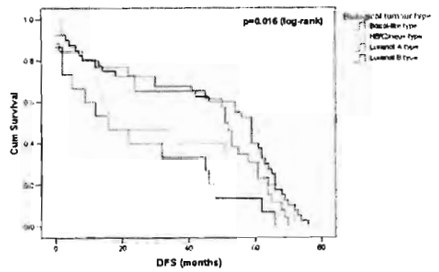


Fig. 2. Analiza Kaplan-Meier a curbelor de supravieţuire generală în funcţie de subtipul biologic

vs. 42,3 şi respectiv 39,2 luni, p=0,016). Parţial, aceste rezultate diferite sunt datorate variaţiilor în răspunsul la tratament. Subtipul triplu negativ răspunde mai puţin favorabil la tratamentul citostatic standard, care include taxani şi antracicline, având în plus şi dezavantajul insensibilităţii la terapia endocrină cu modulatori selectivi de receptori estrogenici (tamoxifen) sau inhibitori de aromatază (anastrozol, letrozol, exemestan).

DISCUŢII

Determinarea statusului receptorilor estrogenici (RE) şi progesteronici (RP) în carcinoamele mamare este utilizată ca factor prognostic şi predictiv şi a devenit un standard de practică în aceste neoplazii. Similar, se impune determinarea pozitivităţii tumorale pentru subunitatea 2 a receptorului factorului uman de creştere epidermală (HER-2/*neu*), element util în selectarea pacientelor pentru noi terapii ţintite cu anticorpi monoclonali împotriva HER-2/*neu* (ex. trastuzumab).

Mai multe studii actuale au investigat semnificatia prognostică a cancerelor triplu negative. Bauer et al., utilizând datele registrului de cancer a statului California, au identificat 6370 de femei cu cancer mamar ca triplu negative dintre 44704 cancere mamare observate în perioada1999 şi 2003. Acest studiu epidemiologic constată, în cancerele mamare etichetate ca triplu negative, afectarea femeilor tinere (vârste >40 de ani), de rasă non-hispanică, non neagră. În ciuda stadiului la momentul diagnosticului, femeile cu cancere mamare triplu negative au prezentat supravieţuiri mai reduse comparativ cu alte cancere mamare. Femeile de culoare, non-hispanice cu cancere triplu negative au prezentat rate de supravieţuire a 5 ani de numai 14% (8).

Un alt studiu pe 234 paciente triplu negative constată absenţa expresiei receptorilor androgeni precum şi asocierea cu subtipuri histologice de cancer mamar cu grad de diferenţiere redus, susceptibilitatea crescută la dezvoltarea de recidive şi metastaze la distanţă ; de asemenea, s-a constatat corelarea gradului de diferenţiere tumoral redus cu pierderea expresiei caterinelor E şi pozitivitatea expresiei citokeratinelor bazale, a caderinelor P, p53 şi EGFR. În subgrupul pacientelor cu ganglioni negativi (63%),

fenotipul bazal a fost identificat ca singurul marker de prognostic identificat. Cancerele mamare trioplu negative au fost asociate cu rezultate postterapeutice nefavorabile şi astfel ar putea defini un subgrup care ar putea beneficia de intervenţii terapeutice mai agresive (9).

Un studiu asupra a 482 paciente clasificate ca triplu negative prezintă o rată mai scăzută de supravieţuire la distanţă fără metastaze comparativ cu celelalte subtipuri (67% vs 82%), dar nu prezintă un risc mai crescut pentru recidiva locală după terapia conservativă a sânului (10). Un alt grup de studiu constată responsivitatea crescută a pacientelor cu cancere mamare triplu negative la terapiile care utilizează megadoze (*high dose*) de chimioterapie cu agenţii alkilanţi (11).

Corkey et al. identifică eficacitatea terapiilor biologice anti EGFR asupra răspunsului la gefitinib, inhibitor de tirozinkinazic a receptorului factorului de creştere epidermal (EGFR) deoarece semnalele asociate EGFR sunt active constituţional în acest subtip particular de tumori deşi acestea nu sunt în majoritate HER-2/*neu* pozitive (12).

Dovezile provenite din cercetări actuale certifică ideea mai veche conform căreia cancerul mamar reprezintă un grup heterogen de boli, cu profiluri terapeutice diferite. Acest fapt a fost confirmat de studiul expresiei genelor implicate în tumori, în particular al profilului molecular a cancerului mamar, revoluţionat de introducerea unor metode care permit măsurarea expresiei a mii de gene simultan. Noile tehnologii *microarray* au atestat heterogenitatea clinică şi biologică a cancerului mamar, explicând diferenţele prin structura genetică a tumorilor primare. Impresia clinică asupra diversităţii aspectelor cancerului mamar a fost astfel probată la nivelul expresiei genice.

Recent, aplicarea noilor tehnologieii de studiu genic în carcinoamele mamare invazive a identificat cel puţin 5 subtipuri moleculare distincte, cu morfologie similară dar comportament biologic diferit: „normal", luminal A, luminal B, cu supraexpresia HER-2/*neu* şi bazal-*like*.

Acesta din urmă, reprezentând circa 15% din toate cancerele mamare, este caracterizat de negativitatea RE, RP şi HER-2/*neu*, şi îşi datorează denumirea originii presupuse în stratul bazal al UTDL. Se asociază cu histologie agresivă, prognostic nefavorabil şi lipsa de răspuns la terapiile uzuale, precum şi cu o supravieţuire mai redusă şi mutaţii ale genelor BRCA1. De asemenea, subtipul de cancer mamar cu parametrii de „triplu negativ" prezintă unele caracteristici clinice particulare:

- este diagnosticat, la un număr mare de paciente, la vârste relativ tinere (mai puţin de 40-50 de ani);
- apare în stadii la fel de avansate ca celelalte subtipuri de cancer mamar, dar este mai frecvent identificat în tumori cu grad de diferenţiere histologică mai avansat (G2-3) şi cu un indice de proliferare mai crescut (Ki-67 intens pozitiv) ceea ce explică prognosticul nefavorabil asociat cu acest subtip;
- prezintă o susceptibilitate crescută la mutaţii ale genei supresoare p53;
- chimioterapia cu antracicline/taxani, deşi frecvent utilizată, pare a fi mai puţin eficace în acest grup de tumori (13,14).

CONCLUZII

Identificarea subtipului numit actual triplu negativ este posibilă utilizând trei markeri predictivi disponibili în clinică: RE, RP şi HER-2. Acest subtip exprimă trăsături clinico-biologice distincte, asociate în general cu un prognostic nefavorabil, cu supravieţuire generală, timp până la progresie şi interval liber de boală semnificativ mai reduse faţă de celelalte subtipuri biologice.

Datele obţinute studiul, întreprins pentru a confirmă caracteristicile clinice şi terapeutice ale cancerelor mamare bazal-*like*

definite până în prezent, precum şi pentru a caracteriza mai bine această nouă entitate, sunt concordante cu cele din literatura oncologică disponibilă actual.

Deşi tumorile triplu negative au fost clar identificate ca având un comportament clinic mai agresiv, datele pe termen lung cu privire la rolul predictiv al încadrării în unul sau altul din aceste subtipuri moleculare, decizia terapeutică optimă şi evaluarea rezultatelor în funcţie de noua clasificare sunt obiective importante de studiu.

BIBLIOGRAFIE

1. Petro R, Boreham J, Clarke M et al. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet* 2000; 355: 1822.
2. Wood WC, Muss NB, Solin LJ et al. Malignant tumors of the breast. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA editors. *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, 1415-1470.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000; 406: 747-752.
4. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caladas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?. *J Clin Oncol* 23; 29: 7350-7360.
5. Sorlie T. Molecular portraits of breast cance: tumor subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2667-2675.
6. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001: 98: 10869-10874.
7. Sotiriou C, Neo SY, Mc Schane LM et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10393-10398.
8. Bauer KL, Brown M,Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen-receptor (ER)-negative, progesterone-receptor (PR)-negative and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population based study for the California Cancer Registry. *Cancer* 2007; 109 (9): 1721-1728.
9. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32.
10. Haffty BG, Yang Q, Reiss M et al. Loco-regional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5652-5657
11. De Giorgi U, Rosti G, Frassineti L, Kopf B et al. High-dose chemotherapy for triple negative breast cancer. *Ann Onc* 2007; 18 (1): 202-203.
12. Corkery B et al. Gefitinib enhances response to chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Eur J Cancer* ECCO-14 Abstract book 2007; 5 (4): 185: abstract 2003.
13. Andre F, Domont J, Delaloge S. What can breast cancer molecular sub-classification add to conventional diagnostic tools? *Ann Oncol* 2007; 18 (suppl 9): ix33-ix36.
14. Pusztai L, Azers M, Stec J et al. Gene expression profiles obtain from single pasage fine needle asprirations (FNA) of breast cancer reliably identity prognostic/ predictive markers such as estrogen (RE) and HER-2 receptor status and reveal large scale molecular differences between E-negative and ER-positive tumors. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2406-2415.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi – 2008 – vol. 112, nr. 1

POLIPII RECTOCOLONICI: CARACTERISTICI CLINICE, ENDOSCOPICE ŞI HISTOPATOLOGICE

S.A. Khder[1], Anca Trifan[1], M. Danciu[2], C. Stanciu[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr. T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Institutul de Gastroenterologie şi Hepatologie Iaşi
2 Disciplina de Morfopatologie

COLORECTAL POLYPS: CLINICAL, ENDOSCOPIC, AND HISTOPATHOLOGIC FEATURES (Abstract): **Aim**: To evaluate the prevalence of colorectal polyps in a population from North- Eastern Romania, which underwent colonoscopic examination and to identify their clinical, endoscopic and histopathologic characteristics. **Methods**: A retrospective prevalence study of subjects aged 18-95 years, with no personal or familial history of familial adenomatous polyposis and inflammatory bowel disease, who underwent a colonoscopy. The number, size, gross endoscopic appearance, histopathological examination, and the anatomic location of colorectal polyps were analyzed, as well as the associated diseases. **Results**: Enrolled were 1001 patients (647 men, 354 women), aged 18-95 years (mean: 62.8 ±11.4 years) who were diagnosed with colorectal polyps. Overall, there were 1.534 colorectal polyps, and the majority of them (83.0%) were present in patients over the age of 50 years, from urban area (73.9%) and most of the patients were men (63.8%), and had solitary polyps (61.1%). Three-quarters of polyps were distal (rectum, sigmoid, and descendent colon) in location, and most of them (75.8%) had a size less than 10 mm. Over half of all polyps (54.7%) were pedunculated. Based on the histological structural configuration, 76.5% of all polyps were adenomas, and of these 62.6% were tubular adenomas; malignant polyps have been diagnosed in 82 (5.4%) patients. Associated hemorrhoids, diverticulosis, colorectal cancer, and angiodysplazia were identified in 9.6%, 10% and 1.3%, respectively. **Conclusion**: The prevalence of colorectal polyps in our geographical area is in the range with that observed in other regions of our country. Most of polyps were identified in patients older than 50 years, predominantly men, located in distal colon, had a tubular adenoma histological structure, and frequently associated with hemorrhoids and diverticular disease. **Key words**: COLORECTAL POLYPS, COLONOSCOPY, COLORECTAL CANCER

Cancerul colorectal (CCR) reprezintă una dintre cele mai frecvente afecţiuni maligne, devenind în ultimii ani a doua cauză de mortalitate prin cancer în ţările dezvoltate (1,2,3,4). În România, incidenţa CCR a crescut îngrijorător în ultimele decade, având tendinţa de a depăşi cancerul gastric, care este încă tipul predominant de malignitate digestivă în ţara noastră (5). Creşterea dramatică a incidenţei şi mortalităţii prin CCR are un impact major asupra sănătăţii publice în multe ţări, printre care şi în ţara noastră. Progresele majore făcute în înţelegerea secvenţialităţii modificărilor ce conduc la CCR, care se desfăşoară în timp suficient de lung (în medie 5-10 ani) pentru a lua măsuri de întrerupere a procesului malign, au adus o undă de optimism prin adoptarea unor programe mai agresive de screening, de prevenţie primară şi secundară (4,6,7, 8,9). Se

susţine că, cel mai adesea, CCR se dezvoltă dintr-un polip adenomatos localizat la nivelul colonului sau, respectiv, a rectului (4,6,10). Este deci lesne de înţeles de ce secvenţa polip adenomatos – adenocarcinom colorectal este în prezent principala ţintă a programelor de screening, iar rezecţia endoscopică a polipilor – polipectomia – opreşte transformarea lor malignă, prevenind astfel CCR (11,12,13,14). Colonoscopia reprezintă astăzi o metodă ideală de depistare şi tratament a polipilor rectocolonici înainte de transformarea lor malignă (15,16).

Datele din literatură referitoare la incidenţa polipilor rectocolonici în România sunt sporadice şi diferă semnificativ în funcţie de regiunea geografică, perioada luată în studiu şi metoda de investigaţie folosită (5). Scopul studiului nostru a fost evaluarea prevalenţei polipilor rectocolonici sporadici în populaţia din nord-estul României investigată colonoscopic, descrierea caracteristicilor endoscopice şi morfopatologice ale polipilor identificaţi şi stabilirea de corelaţii clinico-patologice în funcţie de datele clinice, endoscopice şi histologice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul a inclus 1001 pacienţi internaţi în perioada 2001-2005 în Institutul de Gastroenterologie şi Hepatologie Iaşi care au fost diagnosticaţi prin colonoscopie totală cu unul sau mai mulţi polipi colorectali şi la care, în absenţa contraindicaţiilor, s-a practicat polipectomia colonoscopică. Am exclus din studiu pacienţii cu istoric familial sau personal de polipoză sau boală inflamatorie intestinală idiopatică (rectocolita ulcero-hemoragică, boala Crohn). Colonoscopiile au fost efectuate utilizând videoendoscoape Olympus EVIS EXERA (CFQ160AL ; Olympus Corp, Tokyo, Japan). Fiecare polip a fost analizat amănunţit cu privire la următoarele elemente: dimensiune, culoare, aspectul suprafeţei, lobulaţie, aspectul mucoasei din vecinătate, mobilitatea polipului, prezenţa/absenţa semnului cortului, caracteristicile pediculului,

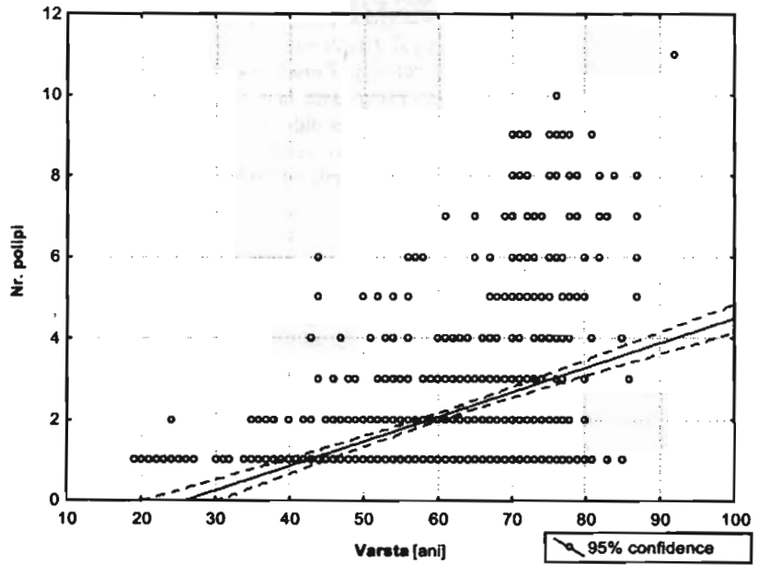


Fig. 1. Dreapta de regresie în corelaţia vârstă vs. numărul polipilor rectocolonici

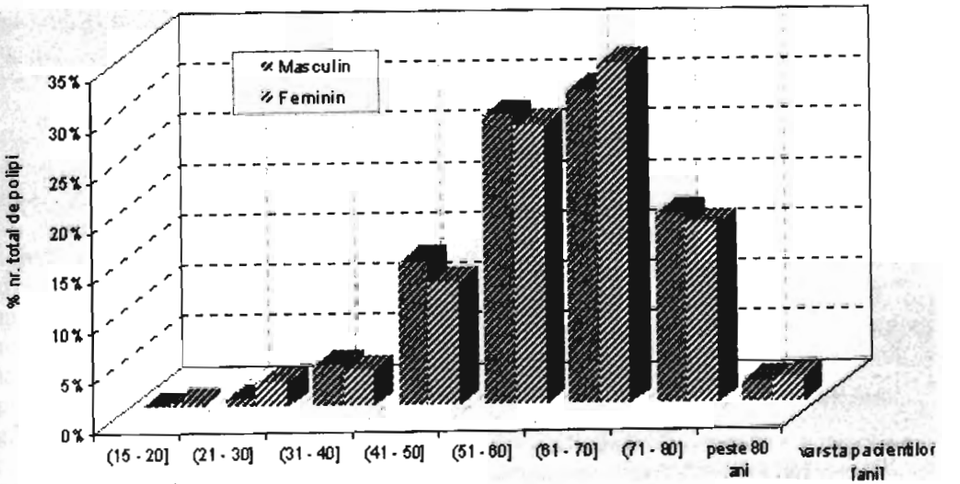


Fig. 2. Repartiţia cazurilor în funcţie de vârsta şi sexul pacienţilor

localizarea şi numărul polipilor. După polipectomie, polipul a fost recuperat, măsurat, fotografiat, apoi fixat în formol tamponat, pH neutru şi trimis Laboratorului de Anatomie Patologică din cadrul Disciplinei de Morfopatologie a Universităţii de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi pentru diagnostic histopatologic. Prelucrarea s-a făcut prin includere la parafină, secţionare şi colorare prin tehnici de rutină (hematoxilină-eozină şi van Gieson). Diagnosticul histopatologic s-a făcut respectând criteriile OMS 2000 (4). Analiza statistică a fost realizată în SPSS, iar rezultatele şi concluziile au fost formulate pentru un interval de încredere de 95%.

REZULTATE

Din totalul de 1001 bolnavi depistaţi cu polipi rectocolonici, 647 (64,6%) au fost bărbaţi şi 354 (35,4%) femei, cu vârsta medie de 62,7± 11,4 ani (limite 18-95 ani).

În majoritatea lor (83%), polipii au fost identificaţi la pacienţi cu vârsta de peste 50 de ani. În ansamblu, se remarcă o creştere progresivă a numărului de polipi în raport cu vârsta pentru ambele sexe (r=0,64, 95% CI) (fig. 1). Distribuţia polipilor rectocolonici pe grupe de vârstă şi sex este prezentată în fig. 2.

Raportat la mediul de proveniență, 740 pacienţi (73,9%) au fost din mediu urban, şi numai 261 pacienţi (26,1%) din cel rural.

Majoritatea pacienţilor (64,6%) au prezentat polipi solitari; polipii multipli (în număr de 647) s-au întâlnit la 354 pacienţi (35,4%).

Aproximativ trei sferturi (76,3%) dintre polipi au fost identificaţi la nivelul colonului distal, localizarea cea mai frecventă a polipilor fiind cea sigmoidiană (44,2%), urmată de cea rectală (22,4%) (fig. 3).

În ceea ce priveşte dimensiunea poli-

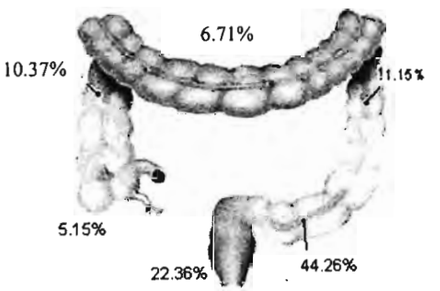


Fig. 3. Distribuţia cazurilor în funcţie de localizare

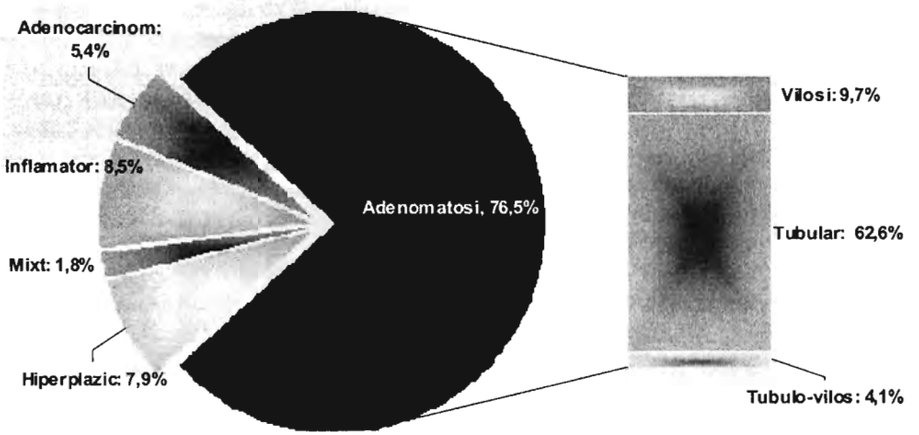


Fig. 4. Distribuţia polipilor rectocolonici în funcţie de structura histologică

pilor, marea lor majoritate (75,8%) au fost mai mici de 1 cm. Polipii cu dimensiuni între 1 şi 2 cm au reprezentat 10,1%, iar cei mai mari de 2 cm au reprezentat 14,1% din totalul polipilor .

Referitor la aspectul bazei de inserţie a polipilor, peste jumătate dintre polipii evidenţiati endoscopic (54,7%) au prezentat pedicul şi 45,3% au fost sesili.

Analiza caracteristicilor histopatologice ale polipilor (fig. 4) a evidenţiat că 1173 (76,5%) dintre aceştia au fost adenoame, dintre care, în 82 de cazuri (5,4%) s-au identificat focare de adenocarcinom. Restul polipilor au fost leziuni non-neoplazice: polipi hiperplazici (7,9%), polipi micşti (1,8%) sau inflamatori (8,5%).

Raportat la tipul arhitectural al polipilor adenomatoşi cel mai frecvent întâlnit a fost cel tubular (62,6%), urmat de cel vilos (9,7%) şi cel tubulo-vilos (4,1%).

Leziunile asociate polipilor au fost prezente la 24,1% din cazuri, acestea fiind reprezentate de hemoroizi (9,6%), diverticuloză (10%), CCR (3,1%) şi angiodisplazie. Prezenţa acestora s-a corelat semnificativ cu vârsta pacienţilor (r=0,532, p= 0,024, 95% CI) fiind mai frecvente la pacienţii cu vârsta peste 50 de ani, dar şi cu dimensiunea crescută a polipilor (r= 0,4911, p= 0,00731, 95% CI).

DISCUŢII

Cancerul colorectal (CCR) este una dintre cele mai frecvente boli maligne în ţările dezvoltate, numărul de cazuri noi diagnosticate anual depăşind 1.000.000 (17,18, 19). Incidenţa CCR a crescut îngrijorător în ultimele decade, în particular la persoanele în vârstă peste 50 ani, devenind a doua cauză de mortalitate prin cancer în America de Nord şi Europa de Vest (1,2,3, 4). În România, aceeaşi creştere semnificativă a incidenţei CCR este observată în ultimii ani, având chiar tendinţa de a depăşi pe cea a cancerului gastric care este încă tipul predominant de malignitate digestivă în ţara noastră (5).

Polipul adenomatos reprezintă principala leziune precanceroasă cunoscută, fiind responsabil pentru cel puţin 85% din numărul total de cazuri de CCR. Secvenţa adenom - cancer se desfăşoară în timp suficient de lung (în medie 5-10 ani) oferind oportunitatea unor măsuri de screening, tratament (polipectomie) şi prevenţie în 75-90% din cazuri (20,21,22,23,24). De aceea, identificarea şi rezecţia endoscopică (polipectomia) a polipilor adenomatoşi rectocolonici scad semnificativ sau chiar înlătură riscul individual de CCR (22,23,25,26,27, 28), concluzie la care s-a ajuns în „National Polyp Study" şi anume că pacienţii menţinuţi „adenoma free" vor rămâne „cancer free" (22,23).

Polipii sunt leziunile cele mai frecvent identificaţe în timpul colonoscopiei. Studiile endoscopice, în concordanţă cu cele necroptice, indică o incidenţă a polipilor rectocolonici de aproximativ 10% la populaţia cu vârstă de 45 ani, dar care creşte progresiv odată cu înaintarea în vârstă, atingând 40-60% la persoanele cu vârsta de peste 60 ani (25,26,27,29,30,31,32 33,34, 35,36,37,38,39,40,41,42). In studiul nostru, distribuţia polipilor rectocolonici pe grupe de vârstă este asemănătoare cu cea întâlnită în alte studii publicate la noi (32,33) sau în străinătate (24); în general există o creştere a incidenţei polipilor cu înaintarea în vârstă, numărul cel mai mare de pacienţi, de ambele sexe, diagnosticaţi cu polipi rectocolonici având vârsta cuprinsă între 60-70 ani.

Similar datelor din literatură (25,26,27, 29,30,31), studiul nostru a evidenţiat predominenţa polipilor rectocolonici la bărbaţi (64,6%). Exprimată comparativ după mediul de rezidenţă, incidenţa polipilor rectocolonici la pacienţii noştri din mediul urban a fost net superioară celei a pacienţilor proveniţi din mediul rural.

Polipii adenomatoşi pot apărea oriunde la nivelul colonului, având însă o predispoziţie pentru colonul stâng; astfel pe primul loc ca localizare a adenoamelor se situează sigmoidul, urmat de rect şi colonul descendent, iar pe ultimul loc este colonul transvers (28,34,35,36). La grupul de pacienţi studiaţi de noi, localizarea cea mai frecventă a polipilor adenomatoşi a fost cea sigmoidiană (44,2%), urmată de cea rectală (22,4%); în ansamblu trei sferturi (77,8%) dintre polipi au fost identificaţi la nivelul colonului distal (rect, sigmoid, descendent).

Polipii adenomatoşi sunt un exemplu de leziuni sincrone şi metacrone. Numărul de polipi, în cazul unui pacient care nu este afectat de un sindrom de polipoză colorectală, nu depăşeşte de regulă 4-5, la un moment dat. În privinţa polipilor metacroni, la un an după polipectomie diagnosticul unui alt polip are o probabilitate de 30% (29,30,31,32,33,34,35,36,37). La majoritatea pacienţilor din studiul nostru (64,6%) colonoscopia a evidenţiat un singur polip; doi sau mai mulţi polipi au fost prezenţi la 35,4% dintre pacienţi.

Majoritatea polipilor rectocolonici adenomatoşi sunt de dimensiuni mici, sub 10 mm; doar 5% din polipii tubulari şi aproximativ o treime din cei viloşi ating 20 mm (36). Polipii adenomatoşi mai mari de 20 mm sunt mai rari şi au un potenţial de malignitate ridicat (38), frecvent conţinând arii de malignitate. Din cei 1534 polipi diagnosticaţi la bolnavii noştri, 75,8% au avut dimensiuni sub 10 mm; doar 14,2% din polipi au avut diametrul de peste 20 mm, dar aceştia au reprezentat cazurile în care tehnica polipectomiei endoscopice a fost mai dificilă, uneori necesitând excizia în secţiuni multiple „bucată cu bucată".

Aspectul endoscopic al polipilor rectocolonici îmbracă o gamă largă de forme, dependentă de tipul de creştere a ţesutului adenomatos (vertical sau orizontal), viteza de creştere (polipii cu creştere lentă sunt mai frecvent pediculaţi) şi peristaltica segmentului de colon pe care sunt localizaţi. La dimensiuni mici majoritatea polipilor adenomatoşi sunt leziuni sesile, cu suprafaţă lipsită de lobulaţii, iar din punct de vedere histologic sunt obişnuit adenoame tubulare, fără displazie severă şi fără arii de malignizare (39,40,41). Polipii pediculaţi mai mari de 10 mm au suprafaţa mai roşie decât restul mucoasei (aspectul de „căpşună"), iar pedicului poate fi subţire sau gros, scurt sau lung. Capul polipului adenomatos tubular fără arii de malignitate este sferic şi

regulat; când capul polipului are inegalitate de culoare şi lobulaţii multiple, adenomul este probabil vilos sau tubulo-vilos, cu displazie severă. Polipii cu dimensiuni mari şi pedicul gros conţin frecvent focare maligne, iar „prăbuşirea" polipului cu scurtarea pediculului indică prezenţa cancerului invaziv. In studiul nostru ,majoritatea polipilor (76,8%) au fost de dimensiuni mai mici de 10 mm, peste jumătate pediculaţi, iar tipul histologic cel mai frecvent întâlnit a fost cel tubular (62,6%), urmat de cel vilos, caracteristici care sunt asemănătoare celor descrise în alte lucrări publicate la noi sau în străinătate (36). Leziuni asociate polipilor rectocolonici (hemoroizi, diverticuli colonici, cancer colorectal, angiodisplazie) au fost prezente la aproape un sfert dintre bolnavii din lotul nostru, procent apropiat celui semnalat în alte studii anterioare (33).

CONCLUZIE

Prevalenţa polipilor rectocolonici în nord-estul Romaniei se incadrează în limitele celei observate în alte regiuni geografice ale ţării noastre; majoritatea polipilor au fost identificaţi la persoanele în vârstă de peste 50 de ani, frecvent localizaţi la nivelul sigmoidului, cu structură histologică predominant tubulară şi adesea asociaţi cu hemoroizi şi boală diverticulară.

BIBLIOGRAFIE

1. Haggitt RG,Rubin CE. Diseases of colon. In: Yamada T et al. *Textbook of Gastroenterology.* Philadelphia: JB Lippincot Co, 1999, ediţia online.
2. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle P, Buchler M. Colorectal cancer. *Lancet* 2005; 365: 153-165.
3. Ladd AP, Grosfeld JL. Gastrointestinal tumors in children and adolescents. *Semin Pediatr Surg* 2006; 15 (1): 37-47.
4. Hamilton SR, Rubio CA, Vogelstein B. Tumors of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA editors. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Lyon: IARC Press, 2000, 103-145.
5. Setlacec D, Oproiu Al, Popescu I. *Polipii şi polipozele rectocolonice.* Bucureşti: Ed. Medicală, 1988, 36-42.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
7. Forde KA. *Oxford Textbook of Surgery, Colonoscopy.* 2000 (online edition).
8. daSilva GM, Vernava AM. History of colonoscopy. *Clin Colon and Rectal Surg* 2001; 4 (14): 303-308.
9. Trifan A. *Manual de endoscopie.* vol. 2: *Colonoscopia.* Iaşi: Ed. Junimea, 2003.
10. Burgart LJ. Colorectal polyps and others precursor lesions need for an expanded view. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 959-970.
11. Sivak M Jr. Historical commentary. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004; 60 (6): 977-981.
12. Rex DK, Rahmani EZ. Endoscopic therapy for polyps and tumors. In: Yamada T et al. *Textbook of Gastroenterology.* Philadelphia: JB Lippincot Co, 1999, ediţia online.
13. Winawer SJ, Zauber AG, Gerdes H et al. Reduction in colorectal cancer incidence following colonoscopic polypectomy: *Report from the National Polyp Study, Gastroenterology* 1991; 100: A410.
14. Bond JH. Update on colorectal polyps: management and follow-up surveillance. *Endoscopy* 2003; 35: 35-40.
15. Winawer SJ, Zauberm AG. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *Gastroenterol* 2006; 130: 1872-1885.
16. Rex DK, John L. Quality indicators for colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2006; 3 (4): 16-28.

17. Hanastrut MD, Revital K. The prevalence rate and anatomic location of colorectal adenoma and cancer detected by colonoscopy in average risk individuals aged 40-80 years. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 225-262.
18. Jemal A, Tiwari RC, Murray T et al. Cancer statistics 2004. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 8-29.
19. Peeters M, Haller DG. Therapy for early stage colorectal. cancer. *Oncology* 1999; 13: 307-315.
20. Morson B. President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 1974; 67: 451-457.
21. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
22. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ. Randomized com-parison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. *N Engl J Med* 1993; 328: 901-906.
23. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al. The National Polyp Study Workgroup. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-1983.
24. Lieberman DA. Cost-effectiveness model for colon cancer screening. *Gastroenterol* 1995; 109: 1781-1790.
25. Bond JH and the Practice Parameters committee of the American College of Gastroenterology .Polyp guidelines: Diagnosis,treatment, and surveillance for patients with non-familial colorectal polyps. *Ann Intern Med* 1993; 119: 836-843.
26. *** American Society for Gastrointestinal Endoscopy. Guidelines for clinical application: the role of colonoscopy in the management of patients with colonic polyps. *Gastrointest Endosc* 1988; 34 (suppl. 3): 6-7.
27. Lambert. R, Rey J-F, Diebold M-D, Chavaillon A. *Lesions neoplasiques colorectales : classification a l'usage de l'endoscopie.* Paris: Durey, 2002.
28. Classen M, Lightdale CJ, Tytgat GNJ. *Gastroenterological Endoscopy.* New York: Thieme Stuttgart, 2002.
29. Chu KC, Tarone RE, Chow WH et al.Temporal patterns in colorectal cancer incidence, survival, and mortality from 1950 through 1990. *J Nat Cancer Inst* 1994; 86: 997-1006.
30. Fouth PG, DiSario JA, Pardy K et al. The sentinel hyperplastic polyp: A marker for synchronous neoplasia in the proximal colon . *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 1482-1485.
31. Hofstad B, Vatn M. Growth rate of colon polyps and cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997; 7: 345-363.
32. Grigorescu M, Pascu O. *Tratat de gastroenterologie clinică.* Bucuresti: Ed. Tehnică, 1996.
33. Milas D, Pascu O, Tantau M. Polipectomia colonscopică - analiza a 379 cazuri. *Clujul Medical* 1999; LXXII (4):.
34. Shinya H. *Colonoscopy Diagnosis and Treatement of Colonic Diseases.* Tokyo: Igaku Shoin, 1982.
35. Cotton BP, Williams BC. Colonoscopy. In Cotton BP, Williams BC editors. *Practical Gastrointestinal Endoscopy.* 5th ed. Blackwell Science, 2003.
36. Williams CB, Bedenne L. Management of colorectal polyps: is all the efort worthwhile? *J Gastroenterol Hepatol* 1990; 5 (suppl 1): 144-165.
37. Atkin WS, Morson BC, Uzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992; 326: 658-662.
38. Kyzer S., Begin L.R., Gordon P .H., Mitmaker B., The care of patients with colorectal polyps that contain invasive adenocarcinoma. Cancer ,1992,70:2044-2050.
39. Iishi H, Kitamura S, Nakaizumi A et al. Clinicopathological features and endoscopic diagnosis of superficial early adenocarcinomas of the large intestine. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1333-1337.
40. Jass JR. Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas? *World J Surg* 1989; 13: 45-51.
41. Jessup JM, Gallick GE. The biology of colorectal carcinoma. *Curr Probl Cancer* 1992; 16: 261-328.
42. Stanciu C. *Cancerul colorectal: epidemiologie, clinică, prevenţie.* Iaşi: Ed. Gr.T. Popa, 2003.

CARACTERISTICI CLINICE ŞI ALE PROFILULUI LIPIDIC LA PACIENŢII CU PATOLOGIE CARDIO-VASCULARĂ GRAVĂ ASISTAŢI ÎN UNITĂŢI SPITALICEŞTI DIN CLUJ-NAPOCA

Irina Brumboiu [1], G. Simionca [2], Ligia Ursu [3], Dana Savu [2], I. S. Bocşan[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "I. Haţieganu" Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină
1 Disciplina de Boli Infecţioase
2 Spitalul Clinic de Boli Infecţioase Cluj-Napoca

CLINICAL CHARACTERISTICS AND THE LIPID PROFILE OF THE PATIENTS WITH LIVE THREATHENING CARDIOVASCULAR DISEASES ASISTED IN DIFERENT HOSPITALS FROM CLUJ-NAPOCA (Abstract): The knowledge about lipid profile particularities in patients with atheromatous cardiovascular diseases may have therapeutic and prophylactic implications. **Material and method**: Study included patients with acute myocardial infarction (IMA) and stroke (AVC), cared in Cluj-Napoca's hospitals. **Results**: The patients with IMA were from urban area in 76% of cases, 72% were males and 58% had arterial hypertension to. Cholesterolemia over 240 mg% level had 11.9% of patients (17.2% female, 9.8% male with IMA), HDL-cholesterolemia less then 35 mg% had 33.4% of male patients and less then 45 mg%, 64.1% of female IMA patients. Patients with AVC were only male who provided in 59% of cases from urban area, had age average of 63 years old, and 82% of them had arterial hypertension to. The average levels for cholesterol were higher in AVC patients (218.6 mg% from urban area, 211.3 mg% from rural area), for triglycerides were higher in patients with IMA and AVC from urban area. High average level of HDL-cholesterolemia had patient with antecedent alcohol consuming (49.5 mg%), women with IMA (45.09 mg %) and in contrast the smokers had the lowers levels (38.37 mg%). **Key words**: CHOLESTEROL, HDL- CHOLESTEROL, MIOCARDIAL INFARCTION, STROKE

Patologia cardio-vasculară continuă să fie principala cauză de mortalitate în majoritatea ţărilor lumii, atât în cele dezvoltate economic precum şi în cele în curs de dezvoltare. Substratul procesului patologic îl constituie cel mai frecvent arterioscleroza care interesează preferenţial anumite zone circulatorii, determinând manifestări clinice în consecinţă (1,2,3). În formarea plăcilor ateromatoase, fiziopatologic, s-a dovedit că implicarea lipidelor are o importanţă majoră. Extinderea cunoaşterii specificului modificărilor fiziopatologice din patologia cardio-vasculară este importantă datorită posibilelor măsuri care să fie recomandate în atitudinea terapeutică şi în cea profilactică (2,4,5). În contextul acestor caracteristici a patologiei circulatorii, principalul obiectiv al acestui studiu este de a analiza profilul lipidic (pe baza investigaţiilor curente) pentru a identifica particularităţile acestuia la pacienţii cu infarct miocardic acut şi la cei cu accident vascular cerebral ischemic din zona judeţului Cluj.

MATERIAL ŞI METODA

Evaluarea aspectelor privind particularităţile implicării lipidelor în patologia cardio-vasculară a fost realizată prin două studii de tip transversal, unul incluzând pacienţii

spitalizaţi cu infarct miocardic acut (IMA), iar celălalt cazuri cu accident vascular cerebral ischemic (AVC). Pacienţii au fost asistaţi în anul 2004 la Institutul inimii "N. Stăncioiu" şi Clinica de neurologie din Spitalul clinic judeţean de urgenţă Cluj.

După alegerea variabilelor care urmau a fi utilizate în analiza caracteristicilor clinice şi a profilului lipidic al pacienţilor cu patologie cardio-vasculară, am elaborat câte o fişă-chestionar pentru fiecare din cele două afecţiuni, care să permită culegerea unitară a datelor. Ca sursă a datelor am folosit foile de observaţie a fiecărui pacient, regăsite în arhiva clinicilor care au asistat bolnavii. Criteriile de includere au fost diagnosticul principal la externare de infarct miocardic acut, respectiv accident vascular cerebral ischemic şi existenţa în foaia de observaţie a rezultatelor testelor de determinare a nivelelor lipidelor plasmatice. Dintre pacienţii cu AVC am inclus în studiu doar pacienţii de gen masculin pentru a evita eroarea sistematică de informaţie prin neidentificarea în arhiva spitalului a foilor de observaţie a pacienţilor de gen feminin. Determinările de laborator pentru stabilirea nivelelor lipidice au utilizat metoda enzimatic-colorimetrică pentru trigliceride şi colesterol, iar pentru HDL-colesterol metoda (automată) cu enzime-PEG modificate şi dextran sulfat. Interpretarea rezultatelor la fiecare caz şi ulterior pentru fiecare eşantion s-a făcut în colaborare cu un expert în medicină de laborator.

Fiecărui caz identificat i s-a completat o fişă chestionar pe suport de hârtie, după care acestea s-au înregistrat în două baze de date informatizate folosind programul Excel 2002. Confidenţialitatea datelor a fost asigurată prin înregistrarea anonimă şi folosirea codificării pentru evitarea înregistrării repetate a cazurilor. Prelucrarea statistică efectuată cu ajutorul pachetului informatic Epi Info a urmărit caracterizarea pacienţilor din fiecare studiu transversal, iar ulterior comparaţia între cele două afecţiuni prin prisma profilului lipidic.

REZULTATE

A. Studiul transversal privind IMA a cumulat 265 de pacienţi dintre care, după domiciliul stabil, 76% au provenit din mediul urban şi 24% din rural, diferenţă semnificativă statistic ($p<0,05$), ţinând cont de structura populaţiei a aceluiaşi an din judeţul Cluj (66,3% populaţie urbană). Distribuţia după gen a evidenţiat predominanţa semnificativă ($p<0,05$) a pacienţilor de gen masculin, aceştia reprezentând 72% din cazuri.

Vârsta medie a pacienţilor de gen masculin a fost de 57,8 ani (între 22 şi 86 de ani, deviaţia standard DS=13,7 ani), iar a celor de gen feminin de 60,2 ani (a fost între 24 şi 88 de ani şi media, DS=12,7 ani), fără să existe o diferenţă statistic semnificativă ($p>0,05$) între cele două valori medii.

Pe baza modificărilor traseului electrocardiografic, la 12% (31 de cazuri: 20 de bărbaţi şi 11 femei) dintre cazuri s-a diagnosticat IMA non-Q, care a apărut la aceeaşi vârstă medie de 65 ani, indiferent de gen. Infarctul cu unda Q a fost diagnosticat la 234 de cazuri (73% de gen masculin şi 27% feminin), care au avut vârsta medie de 56 ani pentru bărbaţi şi de 59 ani la femei ($p>0,05$). Frecvenţa IMA non-Q după gen (14,9% dintre cazurile la pacienţi de gen feminin şi 10,5% dintre cei de gen masculin) a fost în mod semnificativ ($p<0,05$) mai mare printre cei de gen feminin.

Cele mai frecvente localizări ale IMA au fost: inferioară în 35% din cazuri, anterioară la 22% şi antero-septală la 14% din cazuri (fig. 1).

Angiografia s-a efectuat la aproape un sfert din pacienţi (65 de pacienţi, reprezentând 24,5% din cazuri) şi a evidenţiat ischemie de tip univascular la 42% din cazuri, de tip bivascular la 32% şi la 26% de tip trivascular.

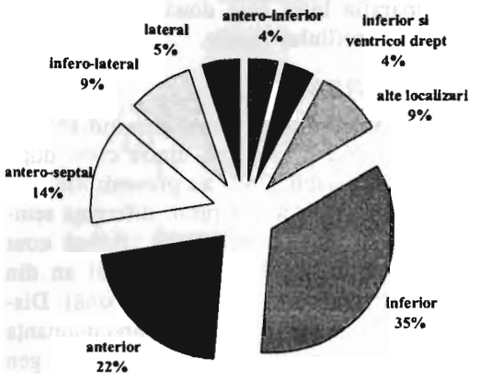


Fig. 1. Localizarea infarctului miocardic acut stabilită pe baza traseului electrocardiografic la pacienţii incluşi în studiu

Patologia cea mai frecvent asociată IMA (prezentă anterior debutului) a fost reprezentată de cardiopatia ischemică cronică (58%), hipertensiunea arterială (54%), dislipidemia (49%) şi diabetul zaharat (18%).

Nivele ale colesterolemiei de peste 240 mg% au avut 11,9 % dintre pacienţi, iar după gen, 17,2% dintre femeile cu IMA, respectiv 9,8% dintre bărbaţii cu IMA – diferenţă care este semnificativă statistic ($p<0,05$) (tab. I).

Valori de peste 150 mg% a trigliceridelor (limita superioară a normalului) au avut 42,2% din cazuri (106 pacienţi), fără să se constate diferenţe importante între cele două genuri (tab. II).

HDL-colesterolemia mai mică decât valoarea prag considerată cu risc crescut pentru ateromatoză (35 mg% pentru bărbaţi şi 45 mg% pentru femei) s-a înregistrat la 33,4% dintre pacienţi şi 64,1% dintre paciente, iar în intervalul de risc mediu (35-55 mg% la bărbaţi şi 45-65 mg% la femei) s-au plasat 56,6% dintre pacienţi şi 20,3 % dintre pacientele cu IMA, diferenţe care sunt semnificative ($p<0,05$) (tab. III, fig. 2,

TABELUL I

Distribuţia după nivelele colesterolemiei şi gen a cazurilor cu infarct miocardic acut

Colesterolemia (mg%)	Toate cazurile (IMA)		Pacienţi de gen feminin		Pacienţi de gen masculin		p
	număr	% cumulat	număr	% cumulat	număr	% cumulat	
0-79	1	0,4	0	0	1	0,5	NS*
80-119	15	6,3	3	4,3	12	7,1	<0.05
120-159	68	33,2	16	27,1	52	35,5	<0.05
160-199	80	64,8	24	61,4	56	66,1	<0.05
200-239	59	88,1	15	82,8	44	90,2	<0.05
240-279	22	96,8	11	98,6	11	96,2	<0.05
280-319	7	99,6	1	100	6	99,4	NS
peste 320	1	100	0	-	1	100	NS
Total	253	-	70	28%	183	72%	-

*NS = nesemnificativ

TABELUL II

Distribuţia după valorile trigliceridemiei şi gen a cazurilor cu infarct miocardic acut

Trigliceridemia (mg%)	Toate cazurile		Pacienţi de gen feminin		Pacienţi de gen masculin		p
	număr	% cumulat	număr	% cumulat	Număr	% cumulat	
sub 150	145	57,8	40	57,1	105	58	NS*
peste 150	106	42,2	30	42,9	76	42	NS
Total	251	-	70	-	181	-	-

*NS = nesemnificativ

TABELUL III

Distribuţia după valorile HDL-colesterolemiei ale cazurilor cu infarct miocardic acut

HDL colesterolemia (mg%)	Toate cazurile		Pacienţi de gen feminin		Pacienţi de gen masculin		p
	număr	% cumulat	număr	% cumulat	Număr	% cumulat	
0-19	2	0,9	0	-	2	1,2	-
20-24	8	4,3	0	-	8	6	-
25-29	30	17,2	8	12,5	22	19	NS*
30-34	30	30,2	6	21,9	24	33,4	<0.05
35-39	57	54,7	17	48,4	40	57,1	<0.05
40-44	34	69,4	10	64,1	24	71,2	<0.05
45-49	30	82,3	6	73,4	24	85,7	<0.05
50-54	12	87,5	4	79,7	8	90	<0.05
55-59	11	92,3	3	84,4	8	95,3	<0.05
60-65	8	96,6	0	84,4	8	100	<0.05
peste 65	10	100	10	100	-	-	-
Total	232	-	64	-	168	-	-

*NS = nesemnificativ

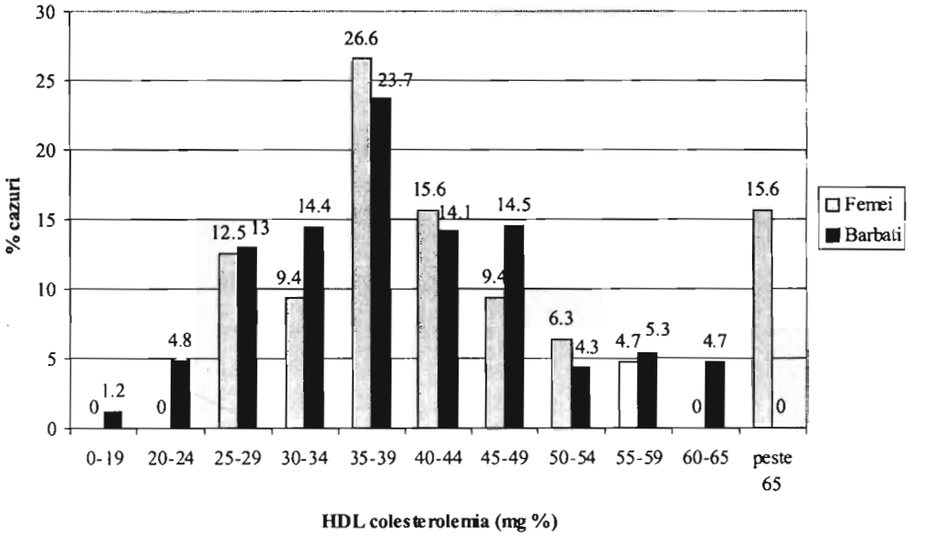


Fig. 2. Distribuţia după valorile HDL colesterolemiei şi gen a cazurilor cu infarct miocardic acut

fig. 3). Concentraţii care creează un risc scăzut (55 mg% la bărbaţi şi 65 mg% la femei) au avut 10% din cazurile la bărbaţi şi 15,6% la femei.

Urmărind diferenţele nivelelor HDL colesterolului înainte şi după menopauză la femeile cu IMA, sub vârsta de 50 de ani (21,8% din cazuri) valoarea medie a fost de 42,26 mg% (deviaţia standard de 12,4 mg%, iar limitele între 25,6 şi 74,6 mg%), iar la peste 50 de ani media a fost de 45,94 mg% (DS = 15,41 cu extreme de 25,9 şi 79,8 mg%), diferenţe nesemnificative statistic.

Un tratament hipolipemiant în momentul stabilirii diagnosticului de IMA a fost

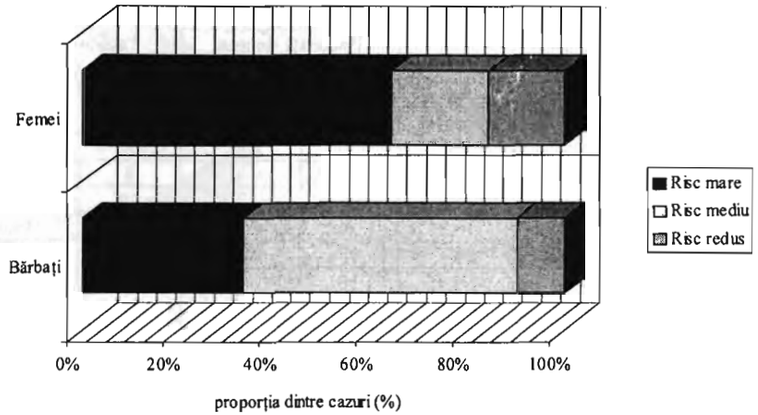


Fig. 3. Distribuţia cazurilor după gen şi categoriile de risc pentru ateromatoză, ţinând cont de valorile prag ale HDL-colesterolemiei

TABELUL IV

Distribuţia cazurilor cu infarct miocardic acut, funcţie de factorii de risc

Factori de risc	Toate cazurile		Pacienţi de gen feminin		Pacienţi de gen masculin	
	număr	%	număr	%	număr	%
Fumători	115	43,4	16	6,0	99	37,4
Fumători şi consum excesiv de alcool	15	5,7	0	-	15	5,7
Consum excesiv de alcool	9	3,4	0	-	9	3,4
Total şi % dintre toţi pacienţii (265)	139	52,5	16	6%	123	46,5

TABELUL V

Distribuţia valorilor HDL colesterolemiei la categoriile de pacienţi incluşi în studiile transversale

Categorii de pacienţi	HDL col. medie (mg%)	Deviaţia standard (mg%)	Val. minimă (mg%)	Val. maximă (mg%)	Nr. cazuri
IMA - gen feminin	45,09	14,76	25,6	79,8	64
IMA - gen masculin	40,17	11,57	19,6	86,1	168
IMA – mediu rural	43,53	13,61	20,1	86,1	58
IMA – mediu urban	40,96	12,36	19,6	86,1	176
IMA – Fumători	38,37	9,27	19,6	68,6	103
IMA - Consum excesiv de alcool	49,55	16,96	29,9	86,1	8
IMA - Fumători care au şi consum excesiv de alcool	46,91	17,91	24	86,1	15

recomandat la 159 de pacienţi (60%), la 131 (49%) dintre aceştia fiind identificată o dislipidemie.

Factori consideraţi a fi de risc pentru bolile cardio-vasculare au fost identificaţi la 52,5% dintre pacienţii cu IMA: obiceiul de a fuma (43,4% din cazuri), consumul excesiv de alcool care a fost prezent doar la bărbaţi - fie singular (la 3,4% din cazuri), fie în asociere cu obiceiul de a fuma (la 5,7% din cazuri) (tab. IV).

Nivelele medii ale HDL-colesterolului au fost semnificativ mai crescute pentru pacienţii care consumau alcool (49,55

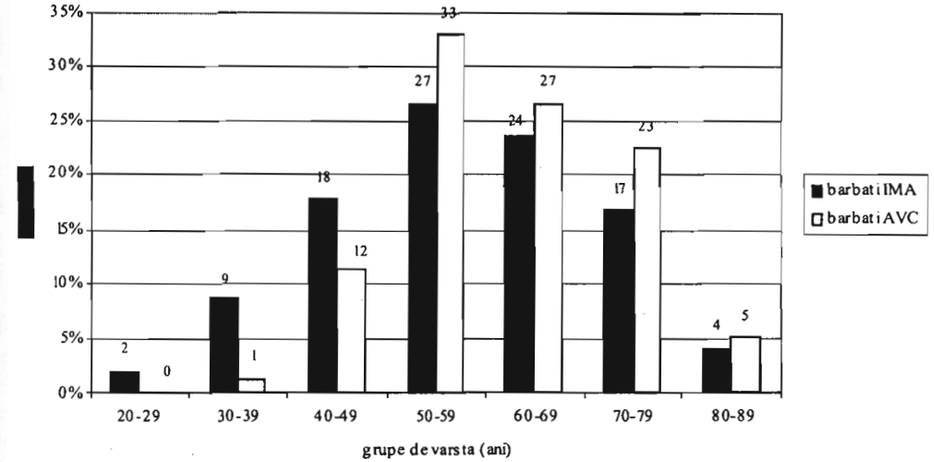


Fig. 4. Distribuţia comparativă după grupele de vârstă a pacienţilor de gen masculin cu infarct miocardic acut şi accident vascular cerebral ischemic

mg%; $p<0,05$) şi femeile cu IMA (45,09 mg%; $p<0,05$) faţă de bărbaţi, cele mai scăzute valori medii le-au prezentat pacienţii fumători (38,37 mg%) şi o valoare intermediară (46,91 mg%) s-a înregistrat la cei cu ambele expuneri prezente (tab. V).

B. Pacienţii cu accident vascular cerebral (AVC) incluşi în studiu au fost în totalitate (173 cazuri) de gen masculin. După mediul de domiciliu cu toate că 59% din pacienţi au provenit din mediul urban, cazurile din mediul rural au fost în exces, populaţia judeţului fiind urbană în proporţie de 66,3%. Vârsta medie a cazurilor a fost de 63 de ani cu limite între 31 de ani minima şi 85 de ani maxima.

În analiza comparativă după grupele de vârstă, faţă de cazurile cu IMA diagnosticate la bărbaţi (şi care au avut vârsta medie de 57,8 ani, cu limite între 22 şi 86 ani), patologia vasculară cerebrală a avut o pondere mai mare ($p<0,05$) la vârste mai înaintate (fig. 4).

Trigliceridemia cu valori de peste 150 mg% a fost identificată la 42% dintre pacienţi cu IMA şi la numai 27,1% ($p<0,05$) dintre cei cu AVC. Nivelele colesterolemiei au fost mai frecvent crescute (peste 240 mg

TABELUL VI

Distribuţia comparativă a pacienţilor de gen masculin cu infarct miocardic acut şi accident vascular cerebral ischemic, în raport cu valoarea colesterolemiei

Colesterolemia (mg %)	Cazuri IMA		Cazuri AVC		p
	Număr	% cumulat	număr	% cumulat	
0-79	1	0,5	0	-	-
80-119	12	7,1	1	0,6	<0.05
120-159	52	35,5	18	11	<0.05
160-199	56	66,1	43	36	<0.05
200-239	44	90,2	62	72,1	<0.05
240-279	11	96,2	36	93	<0.05
280-319	6	99,5	12	100	<0.05
Peste 320	1	100	0	-	-
Total	183	-	172	-	-

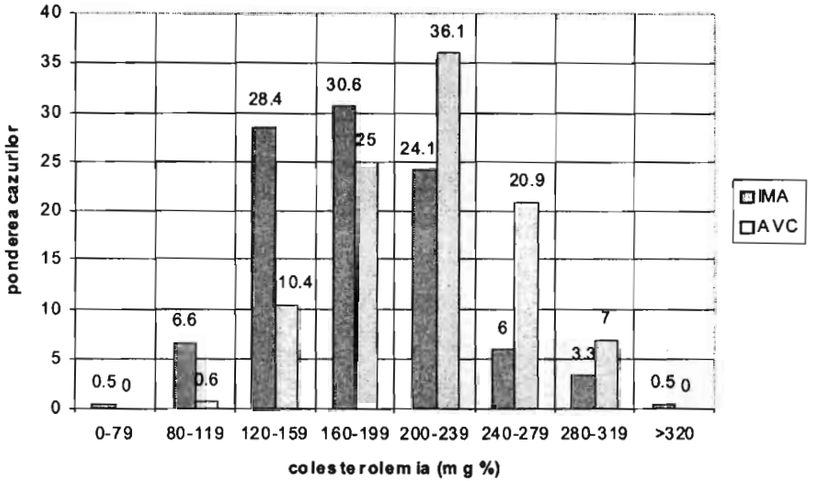


Fig. 5. Distribuţia comparativă a cazurilor cu infarct miocardic acut şi accident vascular cerebral ischemic funcţie de valoarea colesterolemiei

TABELUL VII

Distribuţia valorilor colesterolemiei la categoriile de pacienţi incluşi în studiile transversale

Categorii de pacienţi	Colesterolemia medie (mg%)	Deviaţia standard (mg%)	Val. minimă (mg%)	Val. maximă (mg%)	Nr. cazuri
IMA – gen feminin	189,01	41,02	105	284	70
IMA – gen masculin	183,33	48,59	73	348	183
IMA - mediu rural	185,55	43,64	103	315	60
IMA - mediu urban	184,70	47,60	73	348	193
IMA – Fumători	184,64	50,70	73	348	110
IMA - Consum excesiv de alcool	179,33	51,15	107	256	9
IMA - Fumători care au şi consum excesiv de alcool	193,53	34,89	137	256	15
AVC - mediu rural	211,35	38,93	130	317	70
AVC - mediu urban	218,61	46,14	101	312	102

%) la pacienţii cu AVC faţă de cei cu IMA (27,9% faţă de 9,8% dintre pacienţii cu IMA) (tab. VI, fig. 5).

Din punct de vedere al patologiei asociate la pacienţii cu AVC, hipertensiunea arterială a avut o pondere de 82%, cardiopatia ischemică a fost prezentă la 23%, diabetul zaharat la 23% din cazuri şi obezitatea la 9% din cazuri.

Urmărind valorile medii ale fracţiunilor profilului lipidic, pentru colesterolemie am constatat o valoare semnificativ statistic mai mare ($p<0,05$) la pacienţii cu AVC faţă de cei cu IMA, diferenţele dintre celelalte subgrupe fiind nesemnificative (tab. VII).

Trigliceridemia medie a avut valoarea semnificativ mai crescută la pacienţii cu IMA faţă de cei cu AVC ($p<0,05$) şi la cei cu AVC din urban faţă de cei din mediul rural ($p<0,05$) (tab. VIII). Pacienţii fumători au avut o medie a trigliceridelor de 180,3 mg%, care a scăzut la 141,5 mg% la cei care coexista obiceiul de a fuma şi consumul de alcool, pentru ca la nefumătorii

TABELUL VIII

Distribuţia valorilor trigliceridemiei la categoriile de pacienţi incluşi în studiile transversale

Categorii de pacienţi	Trigliceridemia medie (mg%)	Deviaţia standard (mg%)	Val. minimă (mg%)	Val. maximă (mg%)	Nr. cazuri
IMA - gen feminin	163,30	89,53	37	449	70
IMA - gen masculin	163,29	112,15	42	979	181
IMA - mediu rural	148,03	99,31	37	629	59
IMA - mediu urban	167,98	107,98	42	979	192
IMA – Fumători	180,30	107,87	47	629	109
IMA - Consum excesiv de alcool	129,44	88,93	55	286	9
IMA - Fumători care au şi consum excesiv de alcool	141,50	68,04	56	249	14
AVC - mediu rural	117,74	63,66	37	373	69
AVC - mediu urban	144,51	74,86	37	389	101

consumatori de alcool, media să scadă la 129,4 mg%.

DISCUŢII

Ateroscleroza ca boală generală metabolică cronică, generată de un complex de factori, între care veriga principală este tulburarea metabolismului lipidic, are drept consecinţă anatomopatologică îngroşarea peretelui arterial, cu stenozarea lumenului şi tulburări de irigaţie în teritoriul aferent (3,6,7,8,9). Manifestările clinice sunt mai frecvente la bărbaţi, femeile având până la menopauză o relativă protecţie oferită de hormonii estrogeni care împiedică instalarea hipercolesterolemiei (1,9). Lipsa diferenţelor între vârsta femeilor şi a bărbaţilor care fac un IMA sugerează faptul că la femeile din zona Cluj au intervenit în mod pregnant alţi factori de risc care au reuşit să depăşească factorii de protecţie specifici constelaţiei hormonale anterioară menopauzei, factori care considerăm că ar fi important să fie identificaţi. Acelaşi aspect îl sugerează şi lipsa diferenţei semnificative între valorile medii ale HDL colesterolului la femei înainte şi după vârsta de 50 de ani.

Diferenţa semnificativă a frecvenţei interesării cardiace sau a SNC funcţie de mediul de domiciliu se datorează mai probabil condiţiilor de viaţă diferite care determină comportamente specifice, asociate mai probabil cu factori de risc a căror identificare o considerăm necesară.

Se acceptă că un rol important în apariţia aterosclerozei îl deţin factorii de risc, dintre care cei mai bine cunoscuţi până în prezent sunt hipercolesterolemia, hipertensiunea arterială, obiceiul de a fuma, diabetul zaharat, obezitatea, hipotiroidismul, sedentarismul, alimentaţia bogată în calorii (lipide, glucide rafinate) şi sarea, suprasolicitările şi traumele psihice (stressul) (8,10, 11,12). Consumul moderat de alcool are efect de creştere a nivelelor HDL-colesterolului, dar în cantităţi crescute se ştie că lezează în mod direct muşchiul cardiac, mai ales când se asociază cu deficite nutriţionale (4,7,8,13,14). Obiceiul de a fuma modifică profilul lipidic, însoţindu-se de scăderea HDL-colesterolului.

De altfel şi în cadrul studiului multicentric internaţional de evaluare a prevalenţei HTA şi a unor factori de risc cardiovasculari în rândul populaţiei adulte, efectuat şi în România sub patronajul Societăţii Române de Cardiologie şi al Ministerului Sănătăţii în anul 2005, s-a identificat faptul că la noi în ţară, 46% din populaţia adultă prezintă una sau mai multe modificări ale metabolismului lipidic, ceea ce este mult mai frecvent faţă de celelalte ţări (15).

Asocierea frecventă a hiperetensiunii arteriale, atât cu AVC cât şi cu IMA la pacienţii din zona Cluj, sugerează importanţa practică a analizării modului de gestionare a pacienţilor hipertensivi şi adaptarea monitorizării acestor pacienţi pe baza factorilor identificaţi a crea risc pentru accidente cardio-vasculare majore.

CONCLUZII

Principalele observaţii asupra pacienţilor cu patologie cardio-vasculară gravă din zona Cluj reieşite din cele două studii transversale sunt următoarele:

1. Infarctul miocardic acut (IMA) a apărut semnificativ mai frecvent la persoanele de gen masculin şi din mediu urban.
2. Cazurile cu IMA au prezentat preponderent ischemie univasculară, localizare inferioară şi o frecvenţă relativ mai mare a tipului de IMA nonQ la femei.
3. Modificările metabolismului lipidic la pacienţii cu IMA au constat în principal în hipercolesterolemie şi valori ale HDL-colesterolului sub pragul de protecţie, în special la femei.
4. Accidentul vascular cerebral ischemic (AVC) a apărut mai frecvent la pacienţi din mediul rural şi la vârste mai înaintate decât în cazul pacienţilor cu IMA.
5. Hipercolesterolemia a fost mai frecventă la pacienţii cu AVC, iar hipertrigliceridemia la cei cu IMA.
6. Valorile medii ale colesterolemiei au fost mai mari la pacienţii cu AVC, ale trigliceridemiei la pacienţii cu IMA şi la cei cu AVC din urban, iar HDL-colesterolemia la consumatorii de alcool şi femeile cu IMA, pe când fumătorii au avut cele mai mici valori ale HDL-colesterolului.
7. Rezultatele studiului nostru, concordante cu alte studii cu aceleaşi preocupări, susţin necesitatea identificării precoce şi monitorizării factorilor metabolici şi comportamentali de risc pentru IMA şi AVC.

BIBLIOGRAFIE

1. Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S. The pathogenesis of atherosclerosis. *Handb Exp Pharm* 2005; 170: 3-70.
2. Donald E, Stephen L. Boli cerebrovasculare. In: *Principii de medicină internă*, Bucureşti: Ed. Teora, 2003, 2557-2584.
3. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 18: 47-50.
4. Kerenyi L, Mihalka L, Csiba L et al. Role of hyperlipidemia in atherosclerotic plaque formation in the internal carotid artery. *J Clin Ultrasound* 2006; 6: 283-288.
5. Mitu F, Azoicăi D, Gheorghiţă N. The role of physical training in lipid metabolic parameters in patients with chronic myocardial infarction. *Rev Med Chir* 1995; 1-2: 63-71.
6. Bae HJ, Yoon BW, Kang DW et al. Correlation of coronary and cerebral atherosclerosis: difference between extracranial and intracranial arteries. *Cerebrovasc Dis* 2006; 1-2: 112-119.
7. Glasser SP, Selwyn AP, Ganz P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. *Heart* 1996; 131: 379-384.
8. Gherasim L, Iosifescu D. Aterogeneza - factori de risc. In: *Medicina Internă - Bolile Cardiovasculare şi Metabolice*. Bucureşti: Ed. Medicală, 1999, 519-546.
9. Plesca-Manea L. Tulburarile metabolismului lipidic. In: *Patofiziologie*. Cluj Napoca: Ed. Medicală Universitară Iuliu Haţieganu, 1998, 164-188.
10. Basu AK, Pal SK, Saha S et al. Risk factor analysis in ischaemic stroke: a hospital-based study. *J Indian Med Assoc* 2005; 11: 586-588.
11. Nicholls SJ, Tuzcu EM, Crowe T et al. Relationship between cardiovascular risk factors and atherosclerotic disease burden measured by intravascular ultrasound. *J Amer Coll Cardiol* 2006; 10: 1967-1975.

12. Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD et al. Plasma lipid profile and incident ischemic stroke - the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Stroke* 2003; 3: 623-631.
13. Brousseau ME, Schaefer EJ. New developments in the prevention of atheroslerosis in patients with low high-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscl Rep* 2001; 3: 365-372.
14. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B et al. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 2006; 1: 13-19.
15. Ionescu-Călineşti L. Prevalenţa hipertensiunii arteriale şi evaluarea riscului cardiovascular. *Viaţa medicală* 2006; 842: 6-7.

NOUTĂŢI

DETECŢIA TRISOMIEI 21

Aneuploidiile sunt prezente în aproximativ 5% din sarcini, cauzând majoritatea avorturilor spontane din primul trimestru. Cea mai afrecventă anomalie cromosomică numerică este trisomia 21 (Î50% din cazuri) care determină sindromul Down, caracterizat printr-o dismorfie craniofacială specifică, retard mental şi anomalii congeniatle viscerale (în special cardiovasculare şi digestive). Trisomia 21 omogenă este asociată cu mai mult de 90% din cazurile de sindrom Down şi în majoritatea cazurilor este consecinţa unei nedisjuncţii meiotice materne. Această eroare meiotică este asociată cu vârsta maternă, riscul fiind mai mare la femeile în vârstă. Pe baza acestor date au fost propuse o serie de algortimi care să permită depistarea prenatală a trisomiei 21. Diagnosticul de certitudine implică analiza cromosomică (pe amniocite, celule din vilozităţile corionice sau celule sanguine fetale). Din păcate generalizarea diagnosticului prenatal cromosomic este imposibilă, iar manevrele de recoltare a celulelor fetale implică o serie de riscuri pentru mamă şi făt. Totuşi, pe baza datelor epidemiologice, în Franţa a fost generalizat diagnosticul prenatal citogenetic la femeile cu vârstă mai mare de 38 de ani, ceea ce permite depistarea a circa 30% din cazurile de trisomie 21. Pentru evaluarea celorlalte gravide au fost propuse o serie de teste de screening, care să permită selecţia pacientelor cu risc crescut. Metodele de screening asociază dozările serologice (în primul sau al doilea trimestru de sarcină - α-fetoproteina ↓, gondadotrofina corionică umană (totală sau fracţia β) ↑, estriologul neconjugat ↓ şi proteina plasmatică A asociată sarcinii) cu evaluarea ecografică (existenţa unei translucenţe la nivelul regiunii cefei în săptămânile 11-13 de sarcină). La gravidele la care coroborarea datelor acestor analize atestă un risc mai mare de 1/250 se efectuează testarea prenatală citogenetică. Deşi analiza cromosomică rămâne metoda infailibilă de stabilire a diagnosticului, în ultimii ani au fost propuse o serie de analize moleculare care ar putea constitui tehnici complementare de diagnostic prenatal. Aceste tehnici au avantajul rapidităţii (rezultate în 24-48 h) şi al specificităţii. Principala metodă de diagnostic molecular utilă în depistarea trisomiei 21 este PCR-ul fluorescent cantitativ. Aceste este bazat pe amplificarea selectivă a unor secvenţe repetitive specifice cromosomului 21, prin utilizarea unor amorse marcate fluorescent şi cuantificarea prezenţei secvenţei respective. Metoda este rapidă şi are o specificitate crescută, dar uneori rezultatele pot fi greu de interpretat. O altă categorie de tehnici moleculare, care ar putea să aibă viitor, dar rămâne la stadiul de cercetare, este cea care permite detecţia celulelor fetale în circulaţia maternă, fiind estimat că 3-8% din celulele din sângele matern sunt fetale. În concluzie, autorii estimează că în viitor tehnicile de genetică moleculară ar putea constitui o soluţie complementară la tehnicile de diagnostic prenatal citogenetic (Bouizegarene P, Ameziane N, Bogard M, Deybach JC, Lamoril J. Detection de la trisomie 21 par l'etude de l'ADN. *Immuno-analyse et Biologie Specialisee* 2008; 23: 1-10).

E.V. Gorduza

POLIMORFISMUL GENETIC AL GENEI MTHFR ÎN SCHIZOFRENIE

M. Mavros[1], V. Chiriţă[1], O. Popescu[2], Beatrix Ferencz[2]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Disciplina Psihiatrie
Universitatea "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca
2 Centrul de Biologie Moleculară

THE GENETIC POLIMORPHISM OF MTHFR GENE IN SCHIZOPHRENIA (Abstract): The 677C>T polymorphism of the MTHFR gene, resulting in hyperhomocysteinemia, has been shown to be implicated in the aetiology of schizophrenia. Previous studies showed that A1298 C polymorphism seems not to be related to schizophrenia. **Aim of the study**: To analyze two genetic polymorphisms of the MTHFR gene, 677C>T and A1298 C in 44 patients with schizophrenia and evaluate its relationship with the risk of schizophrenia and with some clinical aspects. **Material and method**: We determined the presence of the 677C>T and A1298 C mutations of the MTHFR gene in 44 inpatients with schizophrenia and in 35 normal controls. The patients were assessed by psychiatric examination and scalar evaluation. **Results**: 28 (66,7%) of the patient group had the T allele of the 677C>T genetic polymorphism, compared to 11 (34,3%) subjects of the control group. The intensity of the positive, negative and general symptoms was slightly higher in the patients presenting the T allele. The A1298C missense mutation was more frequent between control subjects (57,5%) compared to the patient group (39%). The intensity of the positive symptoms was slightly increased in the patients with the missense mutation in the position 1298, but the intensity of the negative and general symptoms did not differ. **Conclusions**: Our study confirms the role of the 677C>T genetic polymorphism in the susceptibility for schizophrenia. The relationship between A1298C genetic polymorphism and schizophrenia was not demonstrated in our study. **Key words**: SCHIZOPHRENIA, MTHFR GENE, 677C>T GENETIC POLYMORPHISM, A1298C GENETIC POLYMORPHISM.

Etiologia schizofreniei şi mecanismele patogenice care stau la baza acestei boli sunt încă departe de a fi clarificate. În ultimii 10 ani au fost identificate câteva gene cu o posibilă implicare în etiopatogenia schizofreniei. Gena pentru metilen-tetrahidrofolat reductază (*MTHFR*) este localizată pe cromozomul 1, braţul p, regiunea 36.3 (1p36.3). Metilen-tetrahidrofolat reductaza este o enzimă cu greutatea moleculară de 74510 Da, care catalizează transformarea homocisteinei în metionină. S-a identificat o mutaţie punctiformă de tip tranziţie în exonul 5, poziţia 677, prin care C este înlocuită cu T, care duce la înlocuirea alaninei cu valina la nivelul proteinei corespunzătoare. Mutaţia punctiformă amintită se corelează cu activitatea redusă a enzimei, datorită termolabilităţii sale (1). Incidenţa homozigoţilor 677C>T (TT) are valori cuprinse între 0-32% în populaţia globală şi între 5-16% în populaţia caucaziană (2,3, 4,5,6,7,8,9). La pacienţii cu genotipul TT nivelul homocisteinei este cu 25% mai mare decât la homozigoţii sănătoşi (CC). Gena pentru MTHFR mai poate fi sediul unei

mutaţii în poziţia 1298, în care A este înlocuită cu C. Această mutaţie are o prevalenţă de 30% în populaţia generală şi este asociată cu scăderea activităţii enzimei şi, implicit, cu nivele crescute ale homocisteinemiei (10) . Homocisteina este un constituent plasmatic cu potenţial neurotoxic. Iniţial s-a demonstrat că hiperhomocisteinemia reprezintă un factor de risc independent pentru bolile cardiovasculare (11) şi pentru boala vasculară cerebrală (12), iar mai recent s-a demonstrat că este un factor independent de risc pentru demenţă (13), boala Alzheimer (14), boala Parkinson, defect de închidere al tubului neural (15), depresie şi schizofrenie (16). Relaţia dintre deficitul de metilen-tetrahidrofolat reductază datorat mutaţiei 677C>T a genei MTHFR şi schizofrenie a fost demonstrată de o serie de studii (17,18,19,20,21,22,23, 24,25,26). Există însă şi câteva studii care nu confirmă această asociere (27,28,29,30, 31). Meta-analizele privind implicarea polimorfismului 677C>T al genei MTHFR în etiologia schizofreniei o confirmă în totalitate (16,32,33,34). Conform mai multor studii, polimorfismul A1298C nu joacă nici un rol în etiologia schizofreniei (19,20,24, 28,30).

OBIECTIV

În acest studiu ne propunem să analizăm două polimorfisme ale genei MTHFR, C677T şi A1298C, la o cohortă de pacienţi cu schizofrenie şi să aprecieze relaţia lor cu etiologia schizofreniei şi cu unele aspecte clinice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Într-o primă etapă, am selectat un număr

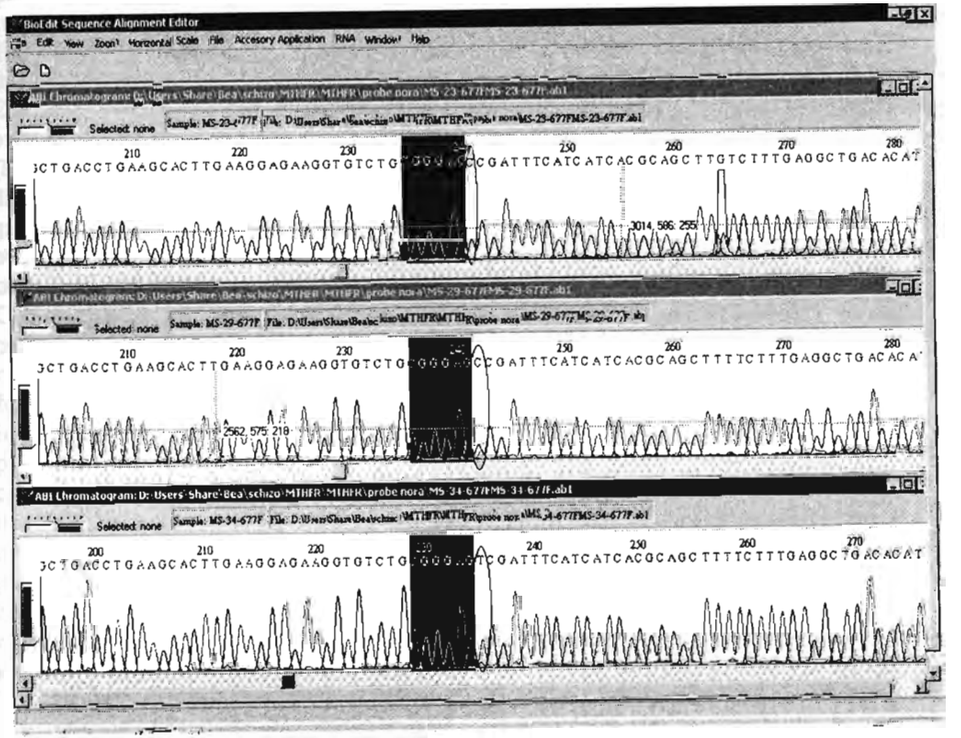


Fig. 1. Polimorfismul poziţiei 677 din gena *MTHFR* (exemplu de aliniere)

de 70 de pacienţi internaţi în Spitalul de Psihiatrie "Socola" Iaşi cu diagnosticul de schizofrenie. Diagnosticul a fost stabilit după criteriile ICD 10. Pacienţilor li s-a cerut acordul de a participa la studiu, li s-a explicat scopul studiului şi li s-a solicitat să semneze un formular de consimţământ. Au semnat consimţământul informat 52 de pacienţi şi, în final, s-a recoltat sânge de la 44 de pacienţi. Cei 44 de pacienţi au fost supuşi unui examen psihiatric complet. În plus, prezenţa şi intensitatea simptomelor negative şi pozitive a fost evaluată utilizând o scală (PANSS modificat) care a cuantificat intensitatea fiecărui simptom cu un scor de la 1 (absent) până la 7 (extrem).

Probele recoltate de la pacienţi au fost transportate în aceeaşi zi la Centrul de Biologie Moleculară din cadrul Universităţii Babeş-Bolyai Cluj. La Centrul de Biologie Moleculară s-a izolat ADN-ul genomic uman din limfocitele prezente în probele de sânge periferic ale celor 44 de pacienţi cu schizofrenie şi din probele a 35 de indivizi sănătoşi (lot de control). S-a realizat apoi amplificarea prin PCR a exonilor şi intronilor de interes din gena pentru metilen-tetrahidrofolat reductază (*MTHFR*) şi genotiparea şi identificarea mutaţiilor prin metode specifice - hărţi de restricţie, secvenţare (fig. 1).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza secvenţelor celor 35 de probe din lotul martor la nivelul locusului C677T a arătat prezenţa genotipului normal CC la 23 de subiecţi (65,7%), a genotipului CT la 7 (20%), iar a genotipului TT la 5 (14,3%). La determinarea secvenţei celor 42 de probe ale lotului de pacienţi s-au obţinut

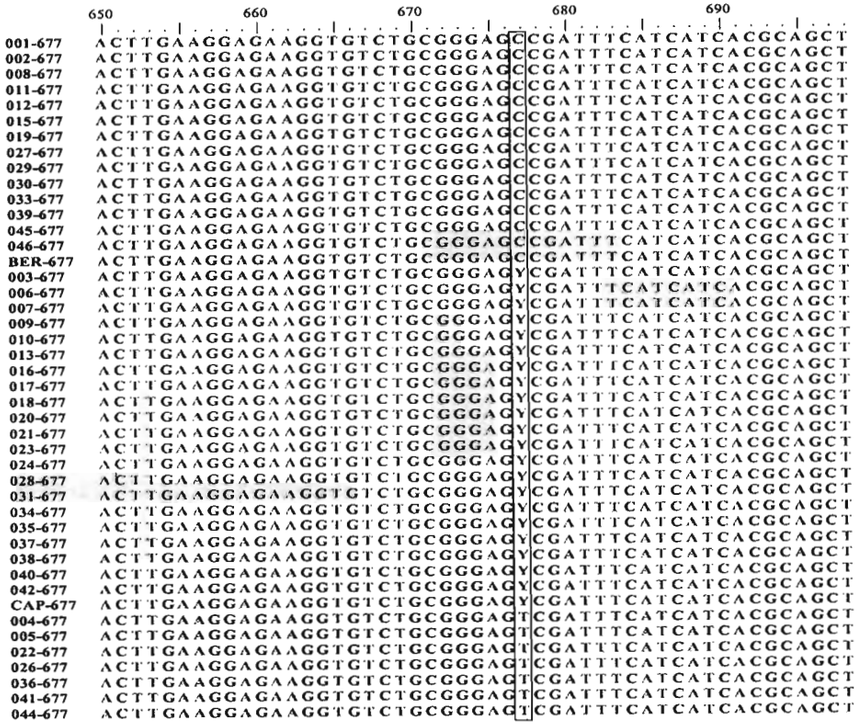


Fig. 2. Lot pacienţi - polimorfismul genei *MTHFR*, pozitia 677

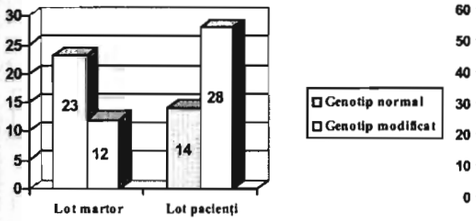


Fig. 3. Distribuţia cazurilor cu genotip normal şi cu genotip modificat în poziţia 677 a genei MTHFR la lotul martor şi la lotul de pacienţi

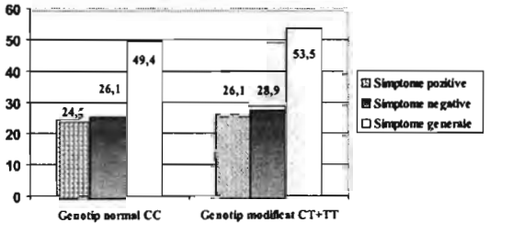


Fig. 4. Scorurile medii ale simptomatologiei pozitive, negative şi generale la pacienţii cu genotip normal (CC) şi modificat (CT+TT)

următoarele rezultate: 14 pacienţi au avut genotipul CC (33,3%), 21 genotipul CT (50%) şi 7 genotipul TT (16,7%) (fig. 2). Se observă prezenţa genotipului C677T modificat la 67,7% din pacienţi, comparativ cu 34,3% dintre subiecţii lotului martor, diferenţa fiind semnificativă (fig. 3). Aceste rezultate indică existenţa unui rol al polimorfismului C677T în etiologia schizofreniei.

Am evaluat intensitatea simptomatologiei pozitive, negative şi generale la cele trei grupuri de pacienţi - cu genotip normal CC, heterozigoţi CT şi homozigoţi TT, prin examen psihiatric şi evaluare scalară (PANSS modificat). Am calculat un scor mediu al simptomatologiei pentru cele trei grupuri de pacienţi. Pentru simptomele pozitive, am obţinut următoarele scoruri medii: 24,5 pentru pacienţii cu genotip CC, 26 pentru cei heterozigoţi CT şi 26,2 pentru cei homozigoţi TT. Scorul mediu al pacienţilor cu genotip anormal (CT+TT) a fost 26,1. Se observă că scorul mediu al intensităţii simptomelor pozitive ale grupului cu genotip anormal este uşor mai crescut faţă de cel al grupului cu genotip normal. Scorurile medii pentru simptomele negative au fost următoarele: 26,1 pentru pacienţii cu genotip CC, 28,1 pentru cei heterozigoţi CT şi 29,7 pentru cei homozigoţi TT. Scorul mediu al pacienţilor cu genotip anormal a fost 28,9. Se observă şi în acest caz că scorul mediu al intensităţii simptomelor negative ale grupului cu genotip anormal este uşor mai crescut faţă de cel al grupului cu genotip normal. Pentru simptomele generale, am calculat următoarele scoruri medii: 49,4 pentru pacienţii cu genotip CC, 51,8 pentru cei heterozigoţi CT şi 55,2 pentru cei homozigoţi TT. Scorul mediu al pacienţilor cu genotip anormal a fost 53,5. Scorul mediu al simptomelor generale este, de asemenea, mai crescut la bolnavii cu genotip anormal faţă de cei cu genotip normal (fig. 4).

Am cercetat dacă există o relaţie între vârsta de debut al bolii şi genotipul MTHFR 677 al pacientului. Am utilizat în acest scop data primei internări, deoarece vârsta reală a debutului a fost dificil de stabilit anamnestic. Am obţinut vârste medii de debut al bolii similare pentru cele trei grupuri de pacienţi, cu genotip normal şi modificat.

Analiza polimorfismului MTHFR în poziţia 1298 la lotul martor a relevat prezenţa genotipului normal (AA) la 17 cazuri (42,5%) şi a genotipurilor modificate, AC la 20 (50%) şi CC la 3 cazuri (7,5%). Evaluarea secvenţei la lotul de pacienţi arată prezenţa genotipului normal AA la 25 (61 %) dintre pacienţi, a genotipului AC la 14 (34,1 %) din pacienţi, iar a genotipului CC la 2 (4,9%) din pacienţi. Se observă că pentru polimorfismul 1298C, variantele modificate au fost prezente la 57,5% din membrii lotului de control, comparativ cu 39% din pacienţi. Rezultatele nu pledează pentru rolul polimorfismului 1298C în schizofrenie (fig. 5).

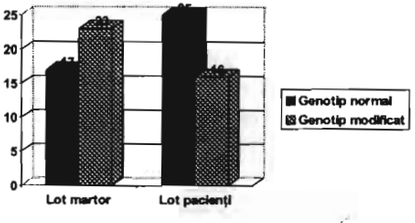


Fig. 5. Distribuţia cazurilor cu genotip normal şi cu genotip modificat în poziţia 1298 a genei MTHFR la lotul martor şi la lotul de pacienţi

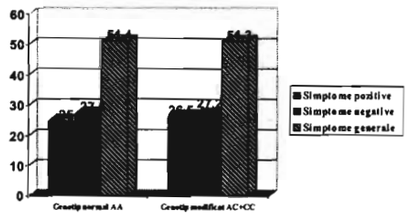


Fig. 6. Scorurile medii ale simptomatologiei pozitive, negative şi generale la pacienţii cu genotip normal (AA) şi modificat (AC+CC)

Am evaluat intensitatea simptomatologiei negative, pozitive şi generale la cele două grupuri de pacienţi - cu genotip normal AA şi modificat (AC +CC), prin examen psihiatric şi evaluare scalară (PANSS modificat). Am calculat un scor mediu al simptomatologiei pentru cele două grupuri de pacienţi. Pentru simptomele pozitive, am obţinut următoarele scoruri medii: 25 pentru pacienţii cu genotip normal şi 26,5 pentru cei cu genotip modificat. Se observă că scorul mediu al intensităţii simptomelor pozitive al grupului cu genotip anormal este uşor mai crescut faţă de cel al grupului cu genotip normal. Scorurile medii pentru simptomele negative au fost următoarele: 27,5 pentru pacienţii cu genotip normal şi, 27,2 pentru cei cu genotip modificat. Se observă că scorul mediu al intensităţii simptomelor negative al grupului cu genotip anormal este similar cu cel al grupului cu genotip normal. Pentru simptomele generale, am calculat următoarele scoruri medii: 51,4 pentru pacienţii cu genotip normal şi 51,3 pentru cei cu genotip modificat. Nu se observă diferenţe între scorurile medii ale simptomelor generale la cele două grupuri (fig. 6).

Am evaluat existenţa unei posibile relaţii dintre prezenţa genotipului modificat în poziţia 1298 şi vârsta de debut al bolii şi am observat că vârstele medii de debut au fost similare la cele două grupuri de pacienţi.

CONCLUZII

1. Studiul nostru pledează pentru rolul polimorfismului 677 C>T în etiopatogenia schizofreniei, deoarece varianta alelică modificată a fost prezentă la 65,7% din lotul de pacienţi comparativ cu 33,3% din lotul martor.

2. Intensitatea simptomatologiei, atât a celei pozitive, cât şi a celei negative şi generale, a fost uşor crescută la pacienţii cu genotip modificat - homozigoţi 677 TT şi heterozigoţi 677 CT, comparativ cu cei cu genotip normal 677 CC.

3. Vârsta debutului bolii nu pare a fi influenţată de prezenţa alelei T şi a genotipului 677 TT, vârstele de debut fiind similare la pacienţii cu genotip modificat (CT şi TT) şi la cei cu genotip normal (CC).

4. Analiza polimorfismului MTHFR în poziţia 1298 nu pledează pentru rolul acestui polimorfism în etiopatogenia schizofreniei, variantele modificate fiind prezente la 57,5% din lotul martor faţă de 39% din lotul de pacienţi.

5. Intensitatea simptomatologiei pozitive a fost uşor crescută la pacienţii cu genotip modificat (1298 AC şi CC) faţă de cei cu genotip normal (1298 AA). Intensitatea simptomatologiei negative şi generale a fost similară la grupul de pacienţi cu genotip modificat (1298 AC şi CC) şi la grupul cu genotip normal (1298 AA).

6. Vârsta debutului bolii nu pare a fi influenţată de prezenţa variantei alelice modificate (C) a polimorfismului MTHFR în poziţia 1298, deoarece vârstele de debut ale grupului de pacienţi cu genotip modificat au fost foarte apropiate de cele ale grupului cu genotip normal.

BIBLIOGRAFIE

1. Goyette P, Summer JS, Milos R, Ducan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; 7: 195-200.
2. Pollak RD, Friedlander Y, Pollak A, Idelson M, Bejarano-Achache I, Blumenfeld A. Ethnic differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in healthy Israeli populations. *Genet Test* 2000; 4 (3): 309-311.
3. de Franchis R, Sebastio G, Mandato C, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T-C mutation, and role of folate. *Lancet* 1995; 346: 1703.
4. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GHJ. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in Methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
5. Ou CY, Stevenson RE, Brown VK et al. 5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996; 63: 610-614.
6. van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P et al Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995; 346: 1070-1071.
7. Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL et al. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 1995; 88: 763-766.
8. Stevenson RE, Schwartz CE, Du YZ, Adams MJ jr. Differences in methylenetetrahydrofolate reductase genotype frequencies, between Whites and Blacks. *Am J Hum Genet* 1997; 60 (1): 229-230.
9. Pennypacker LC, Allen RH, Kelly JP et al. High prevalence of cobalamin deficiency in elderly outpatients. *J Am Geriatr Soc* 1992; 40: 1197-1204.
10. Kumar J, Das S, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Human Genet* 2005; 50 (12): 655-663.
11. Faria-Neto JR, Chagas AC, Bydlowski SP et al. Hyperhomocystinemia in patients with coronary artery disease. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39 (4): 455-463.
12. Cronin S, Furie KL, Kelly PJ. Dose-related association of MTHFR 677T allele with risk of ischemic stroke: evidence from a cumulative meta-analysis. *Stroke* 2005; 36 (7): 1581-1587.
13. Roman GC. Vascular dementia revisited: diagnosis, pathogenesis, treatment, and prevention. *Med Clin North Am* 2002; 86 (3): 477-499.
14. McCaddon A, Regland B, Hudson P, Davies G. Functional vitamin B(12) deficiency and Alzheimer disease. *Neurology* 2002; 58 (9): 1395-1399.
15. Eskes TK. Folates and the fetus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 71 (2): 105-111.
16. Zintzaras E. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a meta-analysis of genetic association studies. *Psychiatr Genet* 2006; 16 (3): 105-15.
17. Arinami T, Yamada N, Yamakawa-Kobayashi K, Hamaguchi H. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. *Am J Med Genet* 1997; 74 (5): 526.
18. Joober R, Benkelfat C, Lal S et al. Association between the methylenetetrahydrofolate reductase 677C—>T missense mutation and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000; 5 (3): 323-326.
19. Sazci A, Ergül E, Güzelhan Y, Kaya G, Kara I. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 117 (1): 104-107.

20. Sazci A, Ergul E, Kucukali I, Kara I, Kaya G. Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia: association is significant in men but not in women. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29 (7): 1113-1123.
21. Muntjewerff JW, van der Put N, Eskes T, Ellenbroek B, Steegers E, Blom H, Zitman F. Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. *Psychiatry Res* 2003; 121 (1): 1-9.
22. Muntjewerff JW, Hoogendoorn ML, Kahn RS et al. Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 135 (1): 69-72.
23. Muntjewerff JW, Gellekink H, den Heijer M et al. Polymorphisms in catechol-O-methyltransferase and methylenetetrahydrofolate reductase in relation to the risk of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 2008: 99-106.
24. Lee YS, Han DH, Jeon CM et al. Serum homocysteine, folate level and methylenetetrahydrofolate reductase 677, 1298 gene polymorphism in Korean schizophrenic patients. *Neuroreport* 2006; 17 (7): 743-746.
25. Kempisty B, Mostowska A, Gorska I et al. Association of 677C > T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett* 2006; 400 (3): 267-271.
26. Kempisty B, Bober A, Luczak M et al. Distribution of 1298A > C polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene in patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Eur Psychiatry* 2007; 22 (1): 39-43.
27. Kunugi H, Fukuda R, Hattori M et al. C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase gene and psychoses. *Mol Psychiatry* 1998; 3 (5): 435-437.
28. Virgos C, Martorell L, Simó JM et al. Plasma homocysteine and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene variant: lack of association with schizophrenia. *Neuroreport* 1999; 10 (10): 2035-2038.
29. Vilella E, Virgos C, Murphy M et al. Further evidence that hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1289C polymorphisms are not risk factors for schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29 (7): 1169-1174.
30. Yu L, Li T, Robertson Z et al. No association between polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene and schizophrenia in both Chinese and Scottish populations. *Mol Psychiatry* 2004; 9 (12): 1063-1065.
31. Philibert R, Gunter T, Hollenbeck N et al. No association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2006; 16 (5): 221-223.
32. Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, den Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2006; 11 (2): 143-149.
33. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: A HuGE review. *Am J Epidem* 2007; 165 (1): 1-13.
34. Lewis SJ, Zammit S, Gunnell D, Smith GD. A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. *Am J Med Genet* 2005; 135 B (1): 2-4.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

TULBURĂRI NEUROPSIHOLOGICE ÎN HEMORAGIA TALAMICĂ STUDIU CLINIC

W. Kalefa[1], Diana Nicoleta Hodorog[2], Felicia Ştefanache[2]
1 Spitalul Clinic de Urgenţă „Sf. Treime" Iaşi
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr. T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Clinica I Neurologie

NEUROPSYCHOLOGICAL DISTURBANCES IN THALAMIC HEMORRHAGE - CLINICAL STUDY (Abstract): Neuropsychological disturbances are frequently associated with hemorrhagic stroke of the thalamus. **Material and method**: We present our personal findings on 117 patients addmited in the I[st] Neurological Clinic, Iaşi with hemorrhagic stroke of the talamus. **Results**: Transcortical aphasia for the left-sided strokes and anosognosia or hemineglect were among the most proeminent clinical features, especially for large thalamic hemorrhage. Visual or tactile extinction, memory disturbances, agitation and hallucinosis were also exhibited in various proportions. **Key words**: THALAMIC HEMORRHAGE, NEUROPSYCHOLOGICAL DISTURBANCES, TRANSCORTICAL APHASIA

Accidentele vasculare cerebrale hemoragice reprezintă aproximativ 15% din totalitatea bolilor cerebrovasculare. Localizarea în talamus a hematoamelor intracerebrale primare este una din cele mai frecvente, mai ales la pacienţii ce au ca factor de risc hipertensiunea arterială (1).

Simptomatologia clinică a hemoragiei talamice este extrem de complexă şi depinde atât de localizarea acesteia în anumiţi nuclei talamici, cât şi de volumul hemoragiei intraparenchimatoase.

Tulburările neuropsihologice reprezintă un aspect important din tabloul clinic al hemoragiei talamice, ce este necesar a fi evaluat la fiecare pacient cu accident vascular cerebral hemoragic cu această localizare. Studiul nostru evaluează acest tip de simptomatologie neurologică, stabilind o serie de corelaţii clinico-topografice şi clinico-imagistice.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul efectuat de autori a inclus 117 pacienţi cu hemoragie talamică internaţi în Clinica I Neurologie, Spitalul Clinic de Urgenţă „Sf. Treime" Iaşi, în perioada 2002-2007, toate cazurile fiind evaluate prospectiv.

Toţi pacienţii au fost evaluaţi neurologic, neuropsihologic, inclusiv pentru evidenţierea tulburărilor de limbaj şi respectiv a simptomatologiei de emisfer şi talamus nedominant. În toate cazurile a fost realizată explorarea imagistică, prin computertomografie şi/sau prin rezonanţă magnetică nucleară.

REZULTATE

Din cazurile studiate, 69 (59%) au fost hemoragii ale talamusului stâng iar 48 (41%) au fost cazuri cu accident vascular

cerebral (AVC) hemoragic talamic drept. Hemoragiile talamice stângi au fost localizate anterolateral în 17 cazuri, posterolateral la 33 pacienţi, în 11 cazuri hemoragia talamică a fost medială, iar la 8 cazuri hematomul talamic a fost situat dorsal. Pentru cazurile cu hemoragie talamică dreaptă topografia a fost următoarea: anterolaterală la 17 cazuri, posterolaterală la 31 pacienţi, 7 cu localizare dorsală şi respectiv în 14 cazuri hematomul talamic a fost situat medial.

Din pacienţii luaţi în studiu, 91 (78%) aveau ca factor de risc hipertensiunea arterială. În 5 din cazurile studiate cu hemoragie a talamusului stâng tabloul clinic a inclus afazie transcorticală tradusă prin:

- hipofonie (perturbarea emisiei cuvintelor),
- perturbarea înţelegerii cuvintelor,
- afectarea limbajului scris asociată perturbării capacităţii de a citi,
- discalculie,
- perturbarea vorbirii spontane cu afectarea capacităţii de comunicare prin fraze, cu prezervarea vorbirii automate şi a celei repetate.

În 7 cazuri cu hematom talamic stâng a fost prezentă dizartria, asociată cu alterarea capacităţii de selecţie, control şi organizare a activităţilor cognitive, dificultate de decodificare şi preluare a informaţiei, deficit polimodal de integrare a percepţiilor senzitiv-senzoriale, hipoprosexie.

Din cazurile luate în studiu, 3 pacienţi au prezentat afazie globală, iar în 5 cazuri examinarea neurologică a evidenţiat afazie motorie cu afectarea vorbirii repetate, concomitent cu instabilitate cognitivă şi afectarea severă a coerenţei limbajului. Toate aceste elemente traduc în aceste cazuri o alterare deteriorativă extrem de severă, globală, în sfera funcţiilor de cunoaştere. La cei 7 pacienţi s-a stabilit Qiv cuprins între 50-60 şi respectiv un Qinv cu valori de 30-40. La toţi aceşti pacienţi hemoragia talamică a fost localizată posterolateral şi asociată cu atrofie cerebrală difuză.

Doar la 3 din pacienţii luaţi în studiu a fost prezent mutismul, toate cazurile având hemoragie talamică cu localizare în talamusul stâng, hemoragia având un diametru ce depăşea 2 cm.

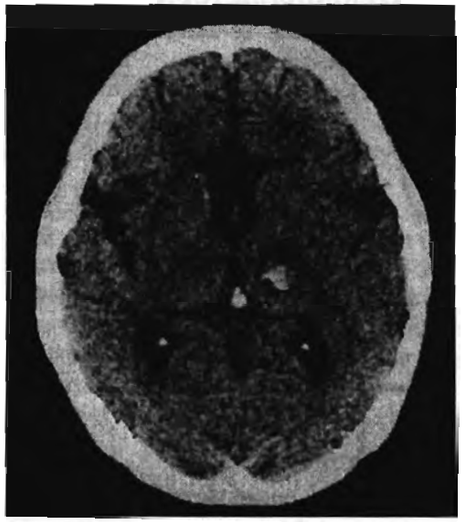


Fig. 1. Computertomografie axială - Hemoragie talamică stângă posterolaterală (Caz 52)

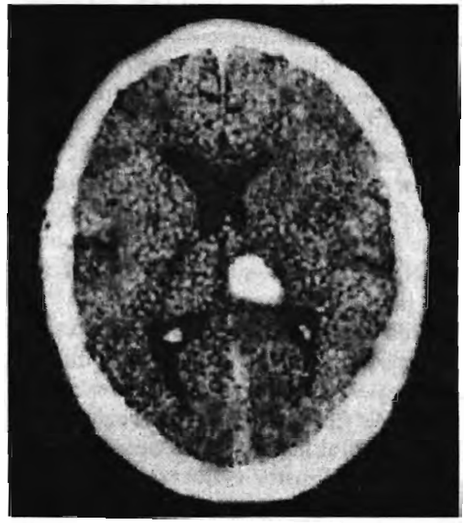


Fig. 2. Computertomografie - Hemoragie talamică stângă dorsală (Caz 91)

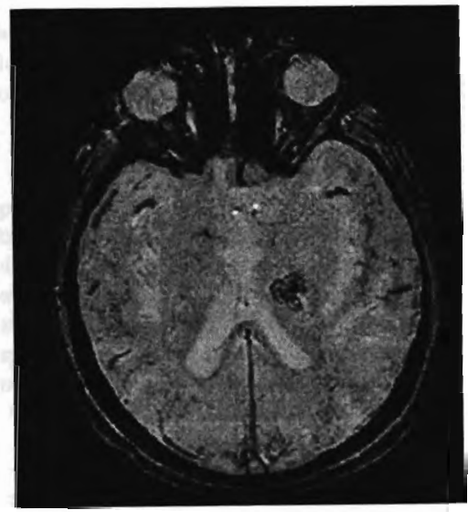


Fig. 3. Imagistică prin rezonanţă magnetică nucleară – Hemoragie talamică stângă posterolaterală (Caz 97)

Pacienţii cu AVC hemoragice cu localizare în hipotalamusul drept au prezentat anosognozia deficitului motor în 12 cazuri, la toţi pacienţii hematomul fiind de dimensiuni mari (> 2 cm diametru). Anozognozia hemiplegiei a fost asociată cu neglijare vizuo-spaţială controlaterală hemoragiei talamice la 17 pacienţi, din aceştia 11 având hemoragii voluminoase. În toate cazurile au fost constatate deficite de localizare spaţială.

Extincţia tactilă şi vizuală au fost întâlnite rar la cazurile studiate, acestea fiind prezente doar la 4 pacienţi. Aceştia au avut hematoame cu localizare anterolaterală în 3 din cele 4 cazuri, iar într-un caz hemoragia talamică a fost anterolaterală. Doar la 5 pacienţi a fost prezentă extincţia auditivă, în toate cazurile fiind prezent un hematom talamic drept posterolateral.

În tabloul clinic al pacienţilor cu hemoragie talamică, halucinaţiile au reprezentat o simptomatologie frecventă, acestea fiind decelate la 17 din cazurile luate în studiu. La 9 din aceştia halucinaţiile s-au asociat cu agitaţie psihomotorie, în 6 cazuri fiind vorba despre hemoragii posterolaterale de dimensiuni variate, iar în 3 cazuri fiind prezent un AVC hemoragic talamic medial de dimensiuni mari.

Mutismul akinetic nu a fost identificat la nici unul din cazurile studiate. De asemenea, demenţa talamică nu a fost identificată la pacienţii din acest studiu prospectiv.

Din cazurile studiate, 8 pacienţi au prezentat tulburări prosexice, deficite severe de selecţie şi denumire, alterarea comprehensiunii, dismnezie antero şi retrogradă, confuzii noţionale. La aceşti pacienţi s-a stabilit Qiv de 65-68 şi Qinv de 60. Datele obţinute au permis aprecierea existenţei la aceşti pacienţi a unei deteriorări globale a funcţiilor de cunoaştere.

În 8 cazuri s-a depistat o încetinire a procesării cognitive, reducerea ritmului psihic şi discretă afectare a funcţiilor mnezice. Valorile apreciate la aceşti pacienţi au fost de Qiv 94-96, respectiv Qinv la valori de 75-82. Acest subgrup a prezentat afectarea cea mai discretă a funcţiilor cognitive, pacienţii fiind diagnosticaţi cu hemoragie talamică posterolaterală.

La 11 pacienţi cu hemoragie cerebrală în talamusul dominant s-a înregistrat un deficit denominativ pentru noţiunile complexe, bradipsihie, organizarea lentă a informaţiei, diminuarea fluenţei verbale, afectarea raţionamentului matematic. Coroborarea acestor elemente a permis diagnosticarea unei disfuncţii psihocognitive discrete, dar globale.

În 2 cazuri cu hemoragie talamică de talamus dominant examinarea psihologică a evidenţiat alterarea severă a fluenţei verbale şi a iniţiativei, perseverare asociată la un deficit important de concentrare, timpi de latenţă prelungiţi pentru comprehensiune şi tulburări perceptive vizuale.

La 2 pacienţi cu hemoragie talamică stângă funcţiile mnezice au fost sever alte-

rate, prosexie cu ritm lent, dar cu păstrarea fluenţei verbale. În aceste cazuri, deşi pacienţii au prezentat o deteriorare globală a funcţiilor de cunoaştere, s-a înregistrat un deficit de conştientizare a alterării neuropsihice.

În 7 cazuri cu hemoragie talamică localizată de partea emisferului dominant a fost diagnosticată o structurare deteriorativă accentuată, cu dominanţă verbală dar şi executivă. Aceasta a fost relevată prin scăderea capacitaţii de operare logică şi reţinere, tulburări de vorbire cu scăderea fluenţei verbale, denumire şi reactualizare cu creşterea timpului de reacţie, dificultate perceptivă mixtă, afectarea globală a funcţiei executive.

La 3 pacienţi cu AVC hemoragic talamic stâng a fost evidenţiată somnolenţă tranzitorie, inatenţie şi în evoluţie tulburări de memorie, abulie, retard psihomotor. Explicaţia acestei simptomatologii clinice ar putea fi reprezentată de întreruperea căilor talamofrontale. În 4 cazuri cu hemoragie talamică paramediană s-a identificat prezenţa unei amnezii persistente, asociate cu tulburări de atenţie, indiferenţă afectivă, alternanţa agitaţiei şi agresivităţii cu apatia şi prostraţia, încetinirea marcată a răspunsului verbal şi motor.

DISCUŢII

Hemoragiile talamice cu localizare în talamusul emisferului dominant conduc pe de o parte la tulburări de vorbire traduse prin afectarea fonaţiei şi articulării cuvintelor, iar pe de' altă parte la tulburări de limbaj ce conturează o afazie cu diferite caracteristici (2).

Survenirea tulburărilor de limbaj în leziunile talamice este explicată prin conexiunile între talamus şi lobul frontal, în special cu aria motorie suplimentară, prin intermediul pedunculului talamic superior (3).

Indiferent de topografia hemoragiei talamice sub aspectul afectării anumitor grupe nucleare, afazia a survenit în toate cazurile studiate, cu leziune în talamusul dominant. Aceste date sunt concordante cu datele din literatură care susţin ideea unor conexiuni talamofrontale fără specificitate topografică pentru nucleii talamici (4). În acelaşi timp însă, ar exista totuşi o interrelaţie frontală rostrocaudală – talamică mediolaterală.

Deşi în literatură se specifică faptul că leziunile talamice stângi conduc cel mai frecvent la afazie transcorticală, iar în studiul de faţă acest tip de afazie nu a fost cel mai frecvent, numărul mic de cazuri nu permite o concluzie fermă.

Tulburările neuropsihologice sunt citate printre cele mai frecvente simptome ale hemoragiei talamice (5). Acestea au dominat tabloul clinic al pacienţilor cu hemoragie talamică posterolaterală şi au constat în afazie transcorticală primară în cazurile cu AVC hemoragic interesând talamusul dominant sau anozognozie şi hemineglijare în cazul hemoragiilor talamice drepte. Atât tulburarea de limbaj cât şi fenomenele de emisfer nedominant au fost cu atât mai bine exprimate clinic şi mai grave cu cât volumul hemoragiei a fost mai important.

În literatură acest tip de afectare neurologică - tulburare de limbaj sau hemineglijare - sunt corelate mai frecvent cu afectarea nucleilor anteriori sau dorsomediali (6). În studiul nostru pacienţii cu hemoragii anterolaterale au prezentat mai rar afazie comparativ cu cei cu hemoragie localizată în regiunea posterolaterală a talamusului.

Pacienţii cu hemoragie localizată în porţiunea medială a talamusului au prezentat tulburări de limbaj în leziunile de emisfer dominant sau respectiv hemineglijare în leziunile de talamus nedominant doar dacă volumul hemoragiei depăşea 4 ml (peste 2 cm diametru), aspecte citate şi în alte lucrări de specialitate ce vizează acest aspect (7). Volumul mare al hemoragiei localizate în porţiunea dorsală talamică s-a corelat de

asemenea, pe plan clinic, cu simptomatologia neuropsihologică, date ce concordă cu informaţiile din literatură (8,9).

CONCLUZII

În hemoragia talamică tulburările neuropsihologice sunt frecvente, fiind reprezentate de afectarea limbajului, dismnezie, dezorientare în cazul leziunii talamice din emisferul dominant şi respectiv anozognozie asociată tulburărilor de percepţie vizuospaţială în leziunile talamusului nedominant.

Tulburările neuropsihologice survin în toate tipurile de hemoragie talamică, dar cu unele nuanţe sub aspectul complexităţii şi gravităţii acestora ce depind de topografia hematomului talamic.

Hemoragiile talamice posterolaterale par a fi cea mai frecventă formă topografică de AVC hemoragic cu localizare talamică, în acelaşi timp determinând cele mai grave manifestări clinice sub aspectul tulburărilor neuorpsihologice. Acest tip de simptomatologie neurologică se regăseşte şi în cazurile de hemoragie talamică localizată medial, dar numai în cazurile în care volumul acestei hemoragii depăşeşte 2 cm diametru.

BIBLIOGRAFIE

1. Del Mar Saez de Ocariz M, Nader JA, Santos JA, Bautista M. Thalamic vascular lesions. Risk factors and clinical course for infarcts and hemorrhages. *Stroke* 1996 ; 27 : 1530-1536.
2. Aten J, White BJ, Pribram HW. Linguistic and behavioral deficits following thalamic hemorrhage. In : *Clinical Aphasiology Conference*. Oshkosh : BRK Publishers, 1982,119-128.
3. Bruyn RP. Thalamic aphasia. A conceptional critique. *J Neurol* 1989 ; 236 (1) : 21-25.
4. Jonas S. The thalamus and aphasia, including transcortical aphasia : a review. *J Commun Disord* 1982 ; 15 (1) : 31-41.
5. Kumral E, Kocaer T, Ertübey NÖ, Kamuran K. Thalamic hemorrhage : a prospective study of 100 patients. *Stroke* 1995 ; 26 (6) : 964-970.
6. Bilen S, Comoglu S, Sahin Y, Ozbakir S. Thalamic hemorrhage (presentation and prognosis of hemorrhage). *Turk J Med Sci* 2001 ; 31 : 421-423.
7. Manabe Y, Kashihara K, Ota T, Shohmori T, Abe K. Motor neglect following left thalamic hemorrhage : a case report. *J Neurol Sci* 1999 ; 171 (1) : 69-71.
8. Mori S, Sadoshima S, Ibayashi S, Fujishima M, Iino K. Impact of thalamic hematoma on six-month mortality and motor and cognitive functional outcome. *Stroke* 1995 ; 26 (4) : 620-626.
9. Steinke WS, Sacco RL, Mohr JP et al. Thalamic stroke : presentation and prognosis of infarcts and hemorrhages. *Arch Neurol* 1992 ; 49 : 703-710.

OSTEOPENIA LA COPIII CU ARTRITĂ JUVENILĂ IDIOPATICĂ

Tania-Elena Rusu, Alina Murgu, Evelina Moraru, Maria-Magdalena Florea, Ileana Ioniuc, Monica Alexoaie, Aurica Rugină, Stela Goţia

Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi

Facultatea de Medicină

Clinica a II-a Pediatrie

OSTEOPENIA IN CHILDREN WITH JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS (Abstract): The aim of the study was to evaluate the presence and ethiopathogenesis of osteopenia in 41 children with Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA). **Methods**: Bone status was evaluated by quantitative ultrasound using a Sunlight Omnisense 7000s Ultrasound Bone Sonometer. Measurements were performed at the distal radius and midshaft tibia. Results were obtained as Speed of sound (SOS) and Z-score. We used standardised clinical evaluation (modified Giannini's criteria, CHAQ). ESR, Fibrinogen, serum calcium, magnesium, alkaline phosphatase, protein electrophoresis, 25-OH vitamin D (RIA) and urinary Hydroxiproline were obtained in all patients. Osteopenia was present in 15 (36.5%) patients. Statistical analysis was performed with SPSS 13.0. **Results**: Age, sex, age at onset, disease duration, life standards and duration of corticotherapy and methotrexat treatment were not related to osteopenia in our study. The disease activity, evaluated by clinical criteria, ESR and Fibrinogen, was strongly associated with osteopenia ($p<0.001$). Nutritional status was an independent risk factor for osteopenia ($p<0.001$). Low serum calcium ($p=0.034$), magnesium ($p=0.010$), 25-OH vitamin D ($p=0.091$) and alkaline phosphatase ($p=0.31$) were more frequent in patients with osteopenia. Hydroxiproline was increased in all patients with osteopenia ($p<0.001$). **Conclusions**: Osteopenia was a frequent (36.5%) complication of JIA in our study. The disease activity and nutritional status were the most important risk factors for osteopenia. The increase of bone reabsorption was the main pathogenic mechanism of osteopenia in our study. Calcium and magnesium deficits were related to osteopenia. Decrease of bone synthesis was not associated with osteopenia in the present study. **Key words**: OSTEOPENIA, JUVENILE IDIOPATHIC ARTHRITIS, QUANTITATIVE ULTRASOUND

Artrita juvenilă idiopatică este cea mai importantă boală reumatismală a copilăriei, cu o prevalenţă de 7,7-10/100 000 la o populaţie 0-16 ani (1). Scăderea densităţii osoase este o complicaţie frecventă a artritei juvenile idiopatice. Prezenţa osteopeniei juxtaarticulare şi a eroziunilor subcondrale este considerată o caracteristică clasică a artritei juvenile idiopatice (AJI). În ultimii ani a fost descrisă existenţa osteopeniei generalizate la copiii cu AJI, cu o frecvenţă de 30 până la 89% din cazuri. Etiologia osteopeniei din AJI este, probabil, multifactorială, implicând intervenţia citokinelor inflamatorii, activitatea fizică diminuată şi alterarea factorilor nutriţionali, precum şi medicaţia imunomodulatoare (methotrexat) şi antiinflamatoare (în particular corticoterapia) (2,3,4,5,6,7,8,9).

OBIECTIVE

Scopul acestui studiu a fost de a evalua prezenţa, cauzele şi mecanismele de producere ale osteopeniei la un lot de copii cu AJI.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul nostru, de tip cohortă prospectivă, a inclus un număr de 41 de copii (22 de fete şi 19 băieţi), cu vârste cuprinse între 2 şi 17 ani, diagnosticaţi cu AJI conform criteriilor International League of Associations for Rheumatology (ILAR) (10), internaţi în Clinica II Pediatrie a Spitalului Clinic de Urgenţă pentru copii „Sfânta Maria", Iaşi.

Am utilizat evaluarea clinică standardizată a pacienţilor, pe baza unui set de 5 criterii (criteriile lui Giannini modificate) (11):

- Aprecierea stării generale de bine a pacientului de către medic - visual analogue scale (*Vas medic*), scală vizuală de la 0 la 10.
- Aprecierea durerii de către pacient/ aparţinători - visual analogue scale (*Vas pacient*), scală vizuală de la 0 la 10.
- Aprecierea funcţionalităţii prin Child Health Assesement Questionaire (*CHAQ*) care presupune evaluarea copilului prin calificative de la 0-3 (0 = situatia cea mai buna, 3 =situatia cea mai rea) pentru urmatoarele 8 domenii : îmbracare, ridicare, alimentatie, deplasare, igiena, realizarea scopurilor, prehensiune, activitati cotidiene. Scorul total CHAQ este suma celor 8 calificative (12).
- Numărul articulaţiilor cu artrită activă, definite ca articulaţiile tumefiate şi/ sau dureroase cu impotenţă funcţională.
- Numărul articulaţiilor cu impotenţă funcţională.

Evaluarea densităţii osoase a fost realizată prin ultrasonografie cantitativă, utilizând un Ultrasonometru Sunlight Omnisense 7000P. Parametrii evaluaţi prin ultrasonografie au fost SOS (*speed of sound*-viteza de propagare a sunetului) şi scorul Z. Scorul Z este definit ca numărul de deviaţii standard faţă de SOS mediu al copiilor sănătoşi de aceeaşi vârstă, rasă şi sex. Un scor Z sub -1 defineşte osteopenia. Valorile SOS măsurate au fost comparate cu cele stocate în baza de date a aparatului. Măsurătorile au fost realizate la nivelul radiusului distal şi în porţiunea medie a tibiei, la membrul nedominant. SOS se corelează foarte bine cu valorile BMD (*bone mineral density*- densitatea minerală osoasă) măsurate prin metoda DEXA (*dual X-ray absorbtiometry*). Metodele de apreciere a densităţii osoase cu ultrasunete oferă avantajul accesibilităţii, toleranţei excelente şi lipsei efectelor secundare (iradiere absentă) (11,12,13,14).

La toţi copiii s-au realizat următoarele analize de laborator, prin metode standard, din probe de sânge venos recoltate a jeun: VSH, fibrinogen, proteinelectroforeză, calcemie, magneziemie, fosforemie, fosfatază alcalină, hemoleucogramă. La 21 de pacienţi am dozat hidroxiprolina, prin metoda standard, din urina recoltată pe parcursul a 24 de ore. 20 de pacienţi au beneficiat de dozarea 25- hidroxivitaminei D prin radioimunoanaliză (^{125}I RIA).

Prelucrarea statistică a fost realizată prin utilizarea programului SPSS versiunea 13.0 for Windows. Pentru variabilele dihotomice s-a folosit testul Chi^2-Pearson , iar pentru variabilele continue, testul t (Student Fischer) şi metoda intervalelor de confidenţă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din cei 41 de copii, 15 (36,58%) au avut un scor Z sub -1. Osteopenia a fost remarcată la nivelul radiusului distal la 11 copii, iar la 6 la nivelul tibiei.

Distribuţia cazurilor în funcţie forma AJI a relevat faptul că dintre cele 15 cazuri cu osteopenie, 4 au avut forma sistemică de boală, 6 forma poliarticulară, 3 forma oligoarticulară şi 2 entezită, comparativ cu cele 26 de cazuri fără osteopenie, la care diagnosticul a fost de formă sistemică la un caz, formă poliarticulară la 10 cazuri, formă oligoarticulară la 13 cazuri şi entezită la 2 cazuri. Se observă o predominenţă a formei

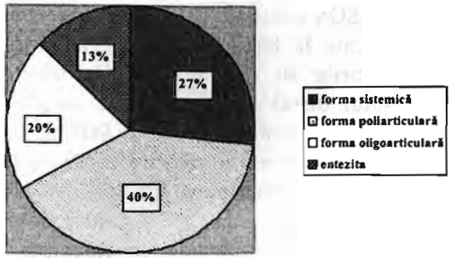


Fig. 1. Distribuţia cazurilor de osteopenie în funcţie de forma AJI

poliarticulare şi sistemice la cazurile cu osteopenie (p=0,34) (fig.1).

Evaluarea asocierii dintre prezenţa osteopeniei şi sex a relevat faptul că 10 (66,7%) din cele 22 de fete au avut osteopenie, comparativ cu 5 (33,3%) din cei 19 băieţi, diferenţă fără semnificaţie statistică (p = 0,205).

Analiza prezenţei osteopeniei în funcţie de mediul de proveniență nu a evidenţiat asocieri (66,7% din pacienţii cu osteopenie din mediul rural vs. 65.4% din cei fără osteopenie din mediul rural).

Vârsta medie a pacienţilor cu osteopenie (12,2 ani) nu a fost diferită de cea a pacienţilor fără osteopenie (12,58 ani). Vârsta medie de debut a bolii a fost similară la cele două grupuri- 9,63 ani la copii cu osteopenie, comparativ cu 10,03 ani la cei fără osteopenie.

Studiul nostru nu evidenţiază rolul duratei de evoluţie a bolii în etiologia osteopeniei, durata medie de evoluţie a bolii în luni fiind de 27,8 luni la copiii cu osteopenie, comparativ cu 31,1 luni la cei fără osteopenie.

Am testat ipoteza conform căreia condiţiile de viaţă deficitare ar putea favoriza apariţia osteopeniei, dar nu am găsit nici o asociere între acestea şi prezenţa osteopeniei, 13 (50%) din bolnavii fără osteopenie având condiţii bune de viaţă, 8 (38%) condiţii mediocre şi 5 (19,2%) deficitare, comparativ cu 8 (53,3%), 4 (26,7%) şi 3 (20%) din bolnavii cu osteopenie.

Evaluarea stării de nutriţie la cele două grupuri de pacienţi a relevat faptul că 7 (46,6%) din cei 15 copii cu osteopenie au avut o stare de nutriţie deficitară comparativ cu 6 (23%) din cei 26 de copii fără osteopenie, sugerând intervenţia factorilor nutriţionali în etiologia osteopeniei (p<0,001).

Cercetarea celor 5 criterii de evaluare clinică standardizată a pacienţilor la cele două grupuri, cu şi fără osteopenie, a pus în evidenţă faptul că bolnavii cu osteopenie au avut o gravitate mai mare a bolii şi un grad crescut de impotenţă funcţională. Astfel, *Vas medic* mediu la bolnavii cu osteopenie a fost de 7,40, comparativ cu *Vas medic* mediu al copiilor fără osteopenie, care a fost 4.08, testul t relevând existenţa unei diferenţe statistic semnificative (p<0,001). Metoda intervalelor de confidenţă este redată în figura 2. Intensitatea durerii percepute de pacient a fost de asemenea mai crescută la copiii cu osteopenie- *Vas pacient* mediu 8.07 comparativ cu cei fără osteopenie - *Vas pacient* mediu 4,77 (p<0,001) (fig.3). Evaluarea prin *CHAQ* a arătat că afectarea funcţionalităţii este mai accentuată la copiii cu osteopenie - scor *CHAQ* mediu 1,76 faţă de cei fără osteopenie- scor *CHAQ* mediu 0,49 (fig.4). Copiii cu osteopenie au avut un număr mai mare de articulaţii cu artrită activă (p=0,009)

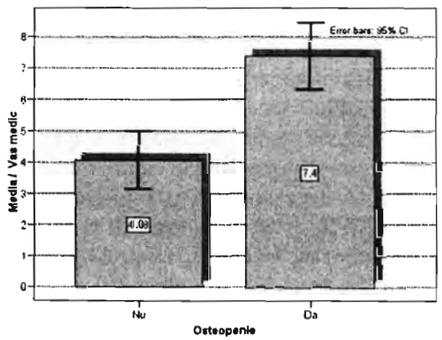


Fig. 2. Asocierea prezenţei osteopeniei cu intensitatea *Vas medic*

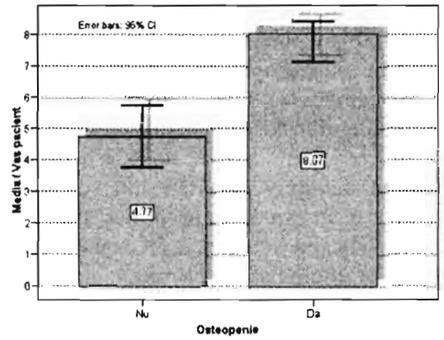


Fig. 3. Asocierea prezenţei osteopeniei cu intensitatea *Vas pacient*

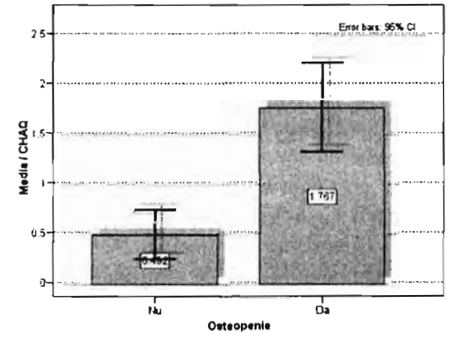


Fig. 4. Asocierea prezenţei osteopeniei cu intensitatea scorului *CHAQ*

şi cu impotenţă funcţională (p=0,005) comparativ cu cei fără osteopenie. Rezultatele noastre concordă cu datele din literatură privind implicarea inflamaţiei active în etiologia osteopeniei din AJI (6,8,15).

Pacienţii cu osteopenie au avut teste de inflamaţie pozitive (VSH, fibrinogen) în 86,6% din cazuri, comparativ cu pacienţii fără osteopenie, la care sindromul inflamator a fost prezent doar în 53,9% din cazuri (p=0,033). În plus, sindromul inflamator sever (VSH peste 50 mm/1 h, fibrinogen peste 7g/l) a fost observat la 33,3% din copiii cu osteopenie în comparaţie cu 15,4% din cei fără osteopenie. Rezultatele pledează pentru rolul inflamaţiei în producerea osteopeniei din AJI.

Investigarea metabolismului fosfo-calcic a relevat prezenţa hipocalcemiei la 6 (40%) din bolnavii cu osteopenie comparativ cu 3 (11,5%) din bolnavii fără osteopenie (p=0,034). Fosforemia a fost în limite normale la toţi pacienţii, cu excepţia unui copil cu osteopenie, la care a fost scăzută. Magneziemia a fost scăzută la 8 (53,3%) din copiii cu osteopenie, comparativ cu 4 (14,4%) din cei fără osteopenie (p=0,010). Deficitul de calciu şi de magneziu pare a juca un rol în etiologia osteopeniei la lotul studiat.

25 OH vitamina D serică a fost scăzută la 6 din cei 14 copii cu osteopenie şi a fost normală la toţi cei 6 pacienţi fără osteopenie la care a fost posibilă dozarea (p=0,091). Se observă că mai mult de jumătate din copiii cu osteopenie au avut un deficit de vitamină D, dar, probabil din cauza lotului mic de pacienţi la care dozarea a fost posibilă nu s-a atins pragul de semnificaţie statistică.

Implicarea diminuării sintezei osoase ca mecanism de producere al osteopeniei din AJI este controversată (3-10). Studiul nostru relevă prezenţa unei sinteze osoase reduse, certificată prin scăderea fosfatazei alcaline la 4 (26,7%) din bolnavii cu osteopenie, comparativ cu 1 (3,8%) din copiii fără osteopenie (p=0,31). Diminuarea sintezei osoase nu pare a fi implicată în apariţia osteopeniei la copiii luaţi în studiu. Fosfataza alcalină a fost crescută la 1 copil cu osteopenie şi la 2 copii fără osteopenie, indicând prezenţa unui rahitism carenţial.

Creşterea resorbţiei osoase este implicată în patogeneza osteopeniei din AJI (3,4, 5,6,7,8,9,10,15,16). Hidroxiprolina urinară a fost crescută la toţi pacienţii cu osteopenie, comparativ cu 2 din cei 8 bolnavi fără osteopenie la care aceasta a fost dozată (p<0,001). Rezultatele indică existenţa unei resorbţii osoase crescute la pacienţi cu osteopenie din lotul studiat.

Corticoterapia şi tratamentul cu metotrexat sunt implicate în etiologia osteopeniei din AJI conform mai multor studii (3,7,17,18,19). Studiul nostru nu pledează pentru implicarea medicaţiei în etiologia osteopeniei la lotul studiat. Astfel, durata medie a corticoterapiei a fost de 3,53 luni la bolnavii cu osteopenie faţă de 1 lună la cei fără osteopenie (p=0,216). Durata medie a tratamentului cu methotrexat a fost de 2,4 luni la bolnavii cu osteopenie faţă de 3,04 luni la cei fără osteopenie. Durata tratamentului cu AINS a fost de 8,20 luni la copiii cu osteopenie faţă de 11,42 luni la cei fără osteopenie.

CONCLUZII

1. Osteopenia a fost o complicaţie frecventă a AJI la lotul studiat, fiind prezentă la 15 (36,5%) din cei 41 de bolnavi.

2. Gravitatea tabloului clinic şi intensitatea testelor inflamatorii au fost crescute la copiii cu osteopenie, ceea ce pledează pentru implicarea inflamaţiei în etiologia osteopeniei din AJI.

3. Evaluarea stării de nutriţie a pus în evidenţă faptul că jumătate din copiii cu osteopenie au avut o stare de nutriţie deficitară, indicând intervenţia factorilor nutriţionali în etiologia osteopeniei.

4. Creşterea markerilor de resorbţie osoasă la toţi copiii cu osteopenie din lotul studiat, alături de normalitatea markerilor de sinteză osoasă la majoritatea pacienţilor (75%) atestă creşterea resorbţiei osoase ca mecanism principal de producere a osteopeniei la lotul studiat.

5. Deficitul de calciu, magneziu şi vitamina D au fost asociate cu riscul de osteopenie la copiii cu AJI luaţi în studiu.

BIBLIOGRAFIE

1. Arion C, Dinu B. Artrite juvenile. In: *Tratat de Pediatrie*. vol. I. coordonator Ciofu E. Bucureşti: Ed. Medicală, 2001, 948-957.
2. Reed A, Haugen M, Pachman L, Langman C. 25-Hydroxyvitamin D therapy in children with active juvenile rheumatoid arthritis: short-term effects on serum osteocalcin levels and bone mineral density. *J Pediatr* 1991; 119: 657-660.
3. Henderson C, Cawkwell G, Specker B et al. Predictors of total body bone mineral density in non-corticosteroid-treated prepubertal children with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1967-1975.
4. Hillman L, Cassidy J, Johnson L, Lee D, Allen S. Vitamin D metabolism and bone mineralization in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1994; 124: 910-916.
5. Elsasser U, Wilkins B, Hesp R, Thurnham D, Reeve J, Ansell B. Bone rarefaction and crush fractures in juvenile chronic arthritis. *Arch Dis Child* 1982; 57: 377-380.
6. Bachrach LK. Osteoporosis in childhood and adolescence. In: *Osteoporosis*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001, 151-164.
7. Celiker R, Bal S, Bakkaloglu A et al. Factors playing a role in the development of decreased bone mineral density in juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Int* 2003; 23 (3): 127-129.
8. Reed A, Haugen M, Pachman L, Langman C. Repair of osteopenia in children with juvenile rheumatoid arthritis. *J Pediatr* 1993; 122 (5): 693-696.
9. Rabinovich C. Bone mineral status in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27 (58): 34-37.
10. Petty R, Southwood T, Baum J et al. Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997. *J Rheumatol* 1998; 25: 1991-1994.
11. Giannini E, Ruperto N, Ravelli A et al. Preliminary definition of improvement in juvenile arthritis. *Arthr Rheum* 1997; 40: 1202-1209.
12. Anderson-Gare B, Ruperto N, Berg S et al. The Swedish version of Childhood Health Assessment Questionaire and the Child Health Questionnaire. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 146-150.

13. Njeh CF, Shaw N, Gardner-Medwin JM, Boivin CM, Southwood TR. Use of quantitative ultrasound to assess bone status in children with juvenile idiopathic arthritis: a pilot study. *J Clin Densitom* 2000; 3 (3): 251-260.
14. Gluer C, Wu C, Jergas M, Goldstein S, Genant H. Three quantitative ultrasound parameters reflect bone structure. *Calcif Tissue Int* 1994; 55 (1): 46-52.
15. Gemalmaz A, Discigil G, Sensoy N, Basak O. Identifying osteoporosis in a primary care setting with quantitative ultrasound: relationship to anthropometric and lifestyle factors. *J Bone Miner Metab* 2007; 25 (3): 184-192.
16. Gregg E, Kriska A, Salamone L et al. The epidemiology of quantitative ultrasound: a review of the relationships with bone mass, osteoporosis and fracture risk. *Osteoporos Int* 1997; 7 (2): 89-99.
17. Reed A, Haugen M, Pachman L, Langman C. Abnormalities in serum osteocalcin values in children with chronic rheumatic diseases. *J Pediatr* 1990; 116 (4): 574-580.
18. Stapelton FB, Langman CB, Bittle J, Miller LA. Increased serum concentration of $1,25(OH)_2$ vitamin D in children with fasting hypercalciuria. *J Pediatr* 1987; 110: 234-237.
19. Schneider S, Shane C. Osteoporosis secondary to illnesses and medications. In: *Osteoporosis*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001, 300-326
20. Preston SJ, Diamond T, Scott A, Laurent MR. Methotrexat osteopathy in rheumatic disease. *BMJ* 1993; 52: 582-5.
21. Leong GM, Center JR, Henderson K, Eisman JA. Glucocoticoid induced osteoporosis. In: *Osteoporosis*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2001, 169-184.

NOUTĂŢI

EFECTELE TERAPIEI CU TERIPARATID (TPTD) ASUPRA NIVELURILOR SERICE ALE OSTEOPROTEGERINEI ŞI RANKL LA FEMEILE CU OSTEOPOROZĂ POSTMENOPAUZĂ

Mecanismele care reglează răspunsul anabolic al scheletului la administrarea intermitentă de hormon paratiroid nu sunt pe deplin elucidate. Studiul prospectiv realizat de Anastasilakis AD et al. a avut drept scop evaluarea efectelor administrării preparatului Teriparatid (TPTD), reprezentând forma injectabilă de parathormon (PTH) uman recombinant 1-34, asupra nivelurilor serice de osteoprotegerină (OPG) şi RANKL (activatorul receptorului de pe zona ligand NF-kB) la femei cunoscute cu osteoporoză. Au fost investigate 23 de paciente cu osteoporoză postmenopauză (vârsta medie 66,7+/-1,6 ani) care au primit zilnic 20 mg TPTD, timp de 12 luni. La aceste paciente au fost monitorizate valorile OPG, RANKL, calciu seric total, fosfat seric, fosfataza alcalină, iPTH (parthormon intact), imediat după administrare, la o oră, la o zi şi la o lună de la iniţierea terapiei. Densitatea minerală osoasă (BMD) a fost măsurată înainte şi după 12 luni de tratament cu TPTD. Ca urmare a terapiei s-a observat creşterea concentraţiei calciului seric şi scăderea treptată a iPTH. Nivelurile serice ale OPG au rămas nemodificate, în timp ce valorile RANKL au prezentat o creştere progresivă pe parcursul studiului ($P<0.001$). Nu s-a remarcat nici o corelaţie între nivelurile OPG sau RANKL şi modificările densităţii minerale osoase sau ale valorilor iPTH. În concluzie, terapia cu Teriparatid la femeile cu osteoporoză postmenopauză determină creşterea nivelurilor serice ale RANKL, fără modificarea osteoprotegerinei serice. Aceste efecte ale administrării TPTD par să reflecte creşterea numărului de osteoblaşti şi ar putea fi răspunzătoare de accelerarea ratei de turnover la nivel osos, ca urmare a tratamentului (Anastasilakis AD, Goulis DG, Polyzos SA, Gerou S, Pavlidou V, Koukoulis G, Avramidis A. Acute changes in serum osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor-{kappa}B ligand levels in women with established osteoporosis treated with teriparatide. *Eur J Endocrinol* 2008; 158 (3): 411-415).

Teodora Vremera

FACTORII CARE LIMITEAZĂ RĂSPUNSUL LA TRATAMENT LA COPIII CU ANEMIE SECUNDARĂ INSUFICIENŢEI RENALE CRONICE TERMINALE

Codruţa Iliescu Haliţchi, Mihaela Munteanu, O. Brumariu
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Clinica a IV-a Pediatrie

FACTORS INFLUENCING RESPONSIVENESS TO TREATMENT IN CHILDRENS WITH RENAL ANEMIA IN END STAGE RENAL DISEASE (Abstract): Human recombined erithropoietin had proven its efficiency in the treatment of anemia in chronic dialyzed patients and allows the elimination of complete necessity of transfusion. **Purpose**: We proposed ourselves to identify the factors that limit the answer to the combined treatment with iron and erithropoietin in a group study of 71 children diagnosed with ESRD in the IVth Pediatrics Clinic and included in the chronic dialysis program. **Material and method**: We divided the patients in three groups, in relation to the time in which the patients had reached and maintained the hemoglobin value of 10.5 g/dl under sustained iron treatment, combined with EPO. We analyzed the correlations established between responsively/non-responsively to treatment and the medium value of Hb, Ht, reticulocytes number, plasma value of iron and feritin, the parameters of phospho-calcic metabolism, malnutrition as presence and degree, the age of entrance in dialysis and the duration of renal function support. **Results**: We observed that Hb and Ht have low medium values (Hb-8.44 g/dl, Ht-25.65%) in the non-responsive group, by comparison to the responsive patients group (Hb-10.98 g/dl, Ht -32.31%). The most elevated values of iPTH around 420 pg/ml and the most frequent cases of protein-caloric malnutrition (26.8%) are seen in the non-responsive group to EPO treatment. The age of 13 years old at the entrance in the chronic dialysis program and the time of support of renal function over 21 months are seen in the non-responder group. **Conclusion**: We consider the secondary hyperparathiroidism, the protein-caloric malnutrition, the older age in the moment of entrance in dialysis and the long time of support of renal function factors that are able to influence, in a negative manner, the response to this treatment. **Key words**: RENAL ANEMIA, RESPONSIVENESS TO rHuEPO, CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

Eritropoietina umană recombinantă (rHuEPO) a devenit disponibilă din 1985. De atunci ea şi-a dovedit eficienţa în tratamentul anemiei la pacienţii dializaţi cronic, permiţând eliminarea completă a necesarului transfuzional. Astfel, rHuEPO este considerată cea mai importantă realizare în îngrijirea pacienţilor dializaţi în ultimii 20 de ani (1). Obiectivul lucrării este de a identifica factorii care limitează răspunsul la tratamentul combinat cu fier şi eritropoietină la un lot de copii evaluaţi în Clinica a IV-a Pediatrie.

MATERIAL ŞI METODĂ

Am efectuat un studiu asupra unui lot alcătuit din 71 de copii, cu vârsta cuprinsă între o lună şi 19 ani, diagnosticaâi cu IRC terminală în Clinica a IV-a Pediatrie şi incluşi în program de dializă cronică. Pacienţii au

fost urmăriţi în perioada noiembrie 1995-noiembrie 2006. Am definit „rezistenţa" la tratamentul cu EPO ca imposibilitatea de a atinge valoarea Hb de 10,5 g/dl cu doze de eritropoietină mai mari de 300 UI/kg/săptămână, sau ca necesitatea de a păstra o astfel de doză pentru menţinerea Hb.

Am subîmpărţit pacienţii în trei loturi, în funcţie de perioada în care pacienţii au atins şi au menţinut valoarea hemoglobinei de 10,5 g/dl, sub tratamentul combinat cu EPO şi fier:

- lotul I = pacienţi responsivi, care au ajuns la valoarea Hb de 10,5 g/dl în 6 luni de tratament şi au menţinut această valoare;
- lotul II = pacienţi parţial responsivi, care au atins pragul Hb de 10,5 g/dl în mai mult de 6 luni de tratament
- lotul III = pacienţi nonresponsivi, care nu ajung la valori ale Hb de 10,5 g/dl în toată perioada de urmărire.

Am analizat la aceste trei loturi corelaţiile dintre responsivitatea/nonresponsivitatea la tratamentul cu eritropoietină şi fier şi următorii parametri de studiu: valoarea medie a Hb, Ht, reticulocitelor, sideremiei, feritinemiei, parametrii metabolismului fosfo-calcic (calcemia, fosforemia, raportul Ca´P, valoarea parathormonului intact), prezenţa malnutriţiei şi gradul acesteia, vârsta intrării în dializă şi durata de supleere a funcţiei renale.

REZULTATE

Pacienţii dializaţi incluşi în studiu au prezentat în medie o perioadă de 14,59 ± 14,45 luni în care valoarea hemoglobinei a fost sub 10,5 g/dl. Comparativ cu durata medie de supleere a funcţiei renale (25,83 ± 20,49 luni), se remarcă o diferenţă semnificativă din punct de vedere statistic (t-Student = 3,78; GL = 140; $p < 0,001$) (fig. 1).

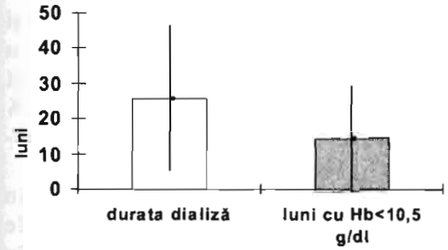


Fig. 1. Valorile medii ale duratei de supleere a funcţiei renale şi ale perioadei cât pacienţii au prezentat Hb < 10,5 g/dl

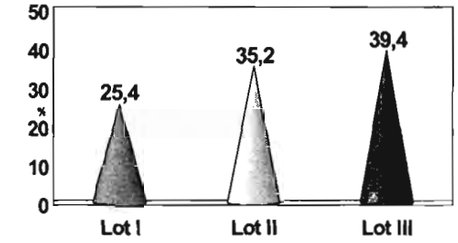


Fig. 2. Distribuţia cazurilor în cele trei loturi de studiu

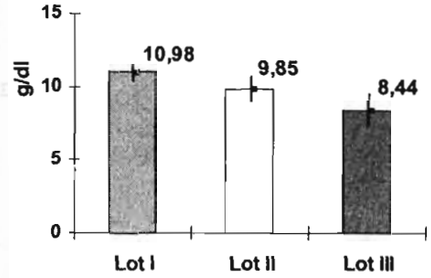


Fig. 3. Valorile medii ale hemoglobinei

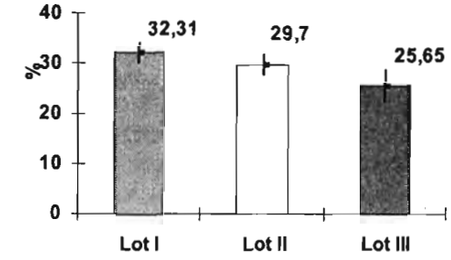


Fig. 4. Valorile medii ale hematocritului

Distribuţia cazurilor pe cele trei loturi de studiu evidenţiază un procent de 25,4% de pacienţi responsivi (lot I) şi frecvenţe aproximativ egale de pacienţi parţial responsivi (35,2%) sau nonresponderi (39,4%) la tratamentul administrat (fig. 2).

În lotul nonresponderilor 64,3% dintre bolnavi sunt de sex masculin, iar în lotul responderilor se remarcă predominenţa sexului feminin (55,6% dintre cazuri), deşi din punct de vedere statistic acest lucru este nesemnificativ.

Hemoglobina, ca principal parametru care clasează cazurile în loturi de studiu, înregistrează valori medii scăzute (Hb=8,44 g/dl) la pacienţii nonresponderi, comparativ cu lotul de pacienţi responsive (10,98 g/dl) (fig. 3).

Valoarea medie a Ht în lotul nonresponderilor nu depăşeşte 25,65%, pe când în lotul responderilor valoarea medie a Ht va depăşi valoarea de 32,31% (fig. 4). Valorile medii ale hemoglobinei şi ale hematocritului prezintă puternice diferenţe semnificative din punct de vedere statistic ($p < 0,001$) în cele trei loturi de studiu, cea mai puternică diferenţă înregistrându-se între loturile responderilor (lot I) şi al nonresponderilor (lot III).

Valorile medii ale reticulocitelor în cele trei loturi de studiu sunt apropiate şi nu diferă semnificativ din punct de vedere statistic. Putem remarca faptul că valoarea medie a reticulocitelor se încadrează între limitele normale în cele trei loturi studiate, sugerând existenţa răspunsului medular la administrarea eritropoietinei umane recombinante genetic. Acest fapt conduce la ipoteza că intervin alţi factori care limitează răspunsul la tratamentul cu EPO.

Valorile medii ale fierului seric şi ale feritinei se încadrează în limite normale la cele trei loturi luate în studiu şi nu diferă semnificativ statistic, conducând la ideea că tratamentul cu fier (în administrare intravenoasa, sau orală) a fost administrat în doze suficiente la cele trei grupuri de pacienţi, asigurând fierul necesar desfăşurării eritropoiezei.

În studiul nostru valorile medii ale calcemiei nu diferă semnificativ statistic între loturi şi se menţin sub limita de 10 mg% în toate cele trei loturi de studiu. Valorile medii ale produsului Ca × P în cele trei loturi sunt apropiate şi nu există diferenţe semnificative din punct de vedere statistic între ele. Valoarea produsului Ca × P rămâne însă sub limita admisa de 5,5 şi subliniază existenţa în grade variate a osteodistrofiei renale la toţi pacienţii luaţi în studiu. Valorile medii ale fosforemiei sunt aproximativ egale în cele trei loturi de studiu şi nu diferă semnificativ statistic. Trebuie subliniat faptul că valorile medii ale acestui parametru au fost apreciate după iniţierea tratamentului cu chelatori de fosfor.

Cea mai mare valoare medie a parathormonului intact este de 420 pg/ml şi este întâlnită în lotul nonresponderilor. La pacienţii responderi la tratamentul cu EPO şi fier valoarea iPTH este normală, iar din punct de vedere statistic se înregistrează diferenţe la pragul de semnificaţie de 95% între lotul de pacienţi responsivi şi cei nonresponsivi (fig. 5).

Studiul nostru semnalează faptul că în grupul nonresponderilor se regăsesc cele mai multe cazuri de malnutriţie (26,8%), în special malnutriţie de gradul I şi de gradul II, dar şi 1,4% dintre cazurile de malnutriţie

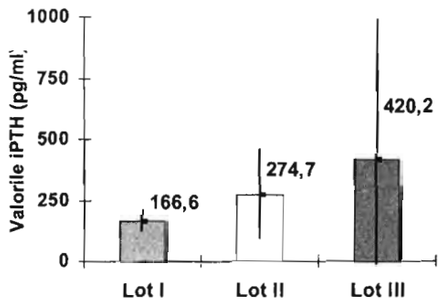


Fig. 5. Valorile medii ale iPTH

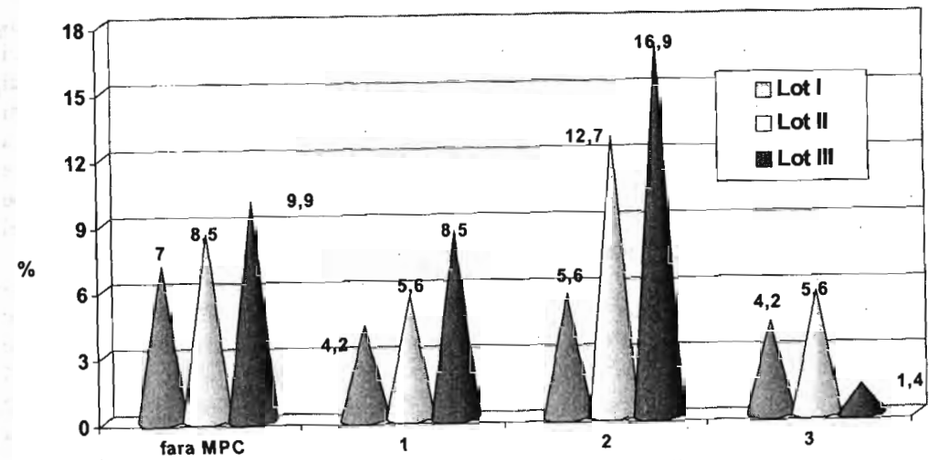


Fig. 6. Gradul de malnutriţie pe loturi de studiu

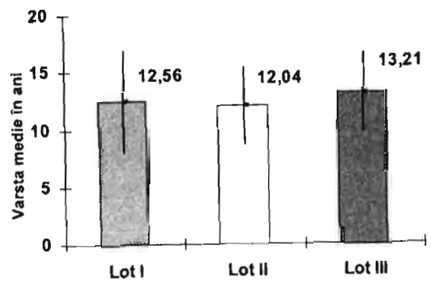


Fig. 7. Vârsta medie a pacienţilor la intrarea în dializă

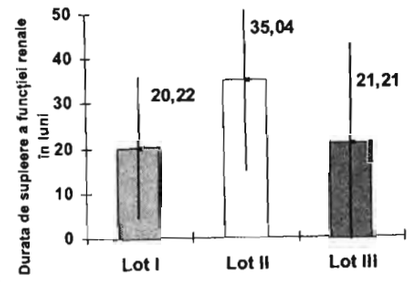


Fig. 8. Valorile medii în luni ale duratei de supleere ale funcţiei renale

de gradul III. Ponderea cea mai mare a malnutriţiei de gradul II este întâlnită în lotul III al nonresponderilor, în timp ce ponderea cea mai mare a malnutriţiei de grad III apare în lotul II al parţial responsivilor (fig. 6). Din punct de vedere statistic însă, repartiţiile de frecvenţe ale malnutriţiei pe loturi de studiu, nu relevă diferenţe semnificative în favoarea lotului III, comparativ cu celelalte loturi ($\chi^2 = 3,37$; GL = 3, $p = 0,34$).

Vârsta intrării în dializă nu diferă semnificativ pe loturi de studiu, dar pacienţii cu vârsta medie de intrare în programul cronic de supleere a funcţiei renale mai mare de 13 ani se regăsesc în lotul nonresponderilor (fig. 7). Durata de supleere a funcţiei renale este semnificativ statistic mai mare la lotul de pacienţi parţial reponsivi, iar la nonresponderi durata medie a programului de dializă depăşeşte 21 de luni (fig. 8). Calculul statistic relevă diferenţe la pragul de semnificaţie de 95% între lotul de pacienţi parţial responsivi şi cei nonresponsivi, din punct de vedere al valorilor medii ale duratei de supleere a funcţiei renale.

DISCUŢII

Un raport publicat recent de Adam E Gaweda, după analiza a 200 de pacienţi trataţi cu EPO pentru anemie renală, a relevat variate grade de răspuns la EPO: 50%

erau responderi, iar 50% erau nonresponderi. Ei au fost urmăriţi timp de 24 de luni, iar obiectivul studiului a fost atingerea şi menţinerea Hb ţintă peste 11,5 g/dl. Se remarcă faptul că doar 1/3 dintre pacienţi reuşesc să atingă ţinta, în 8 luni după iniţierea tratamentului cu eritropoietină şi fier (2). Raportat la numărul de pacienţi incluşi în lotul nostru, rezultatele par comparabile cu cele publicate de Gaweda: o treime din pacienţi reuşesc să atingă ţinta în 6 luni de la iniţierea tratamentului cu EPO şi fier, iar 60,6% dintre pacienţii studiului sunt responderi.

Conform datelor din literatură există o serie de caracteristici ale pacienţilor care afectează răspunsul la EPO şi dozele necesare. Studiul lui Ifudu atrage atenţia că pacienţii de sex feminin, de rasă neagră sau diabeticii hemodializaţi, necesită doze mai mari de EPO pentru a atinge valoarea ţintă a Hb şi a Ht, sugerând intervenţia unor diferenţe biologice în răspunsul la eritropoietină (3,4,5). Alţi factori modulatori ai răspunsului la EPO sunt reprezentaţi de: starea de nutriţie, durata evoluţiei insuficienţei renale cronice terminale, funcţia renală reziduală şi tipul accesului vascular (pentru pacienţii hemodializaţi) (6). În studiul efectuat am remarcat predominenţa sexului masculin la nonresponderi.

Numeroase studii au demonstrat că pacienţii dializaţi, cu hiperparatiroidism secundar sever necesită doze mai mari de eritropoietină pentru corecţia anemiei faţă de pacienţii dializaţi euparatiroidieni (7). Valorile mari ale iPTH necesită doze mai mari de EPO în tratamentul anemiei, pentru a menţine valorile Hb şi ale Ht peste valoarea ţintă recomandată (8). Studiul lui Tonelli, efectuat în 2001 pe un grup alcătuit din 135 de pacienţi hemodializaţi, a raportat doze semnificativ mai mari de EPO la pacienţii cu hipocalcemie, hiperfofatemie şi valori crescute ale iPTH (9). Aceste constatări ale studiilor din literatură se confirmă şi în studiul nostru: în lotul nonresponderilor se înregistrează valori mici ale calcemiei şi cele mai mici valori medii ale produsului Ca × P, precum şi cele mai mari valori ale iPTH. Deci osteodistrofia renală şi în special creşterile semnificative ale iPTH reprezintă un important factor care contribuie la limitarea răspunsului anemiei renale la tratamentul cu EPO.

Îmbunătăţirea stării de nutriţie şi creşterea greutăţii la pacienţii malnutriţi poate permite reducerea dozelor de EPO. Valorile serice scăzute ale albuminei se asociază strâns cu doze crescute de EPO. Numeroase studii semnalează o proporţie crescută a malnutriţiei printre pacienţii cu hiporesponsivitate la EPO, iar ameliorarea malnutriţiei la pacienţii dializaţi ameliorează anemia şi permite reducerea dozelor de EPO (10). Astfel, un studiu efectuat de Kamyar Kalantar-Zadeh et al. pe 59 de bolnavi a descoperit că la pacienţii malnutriţi sunt necesare doze mai mari de EPO (11). Această constatare este valabilă şi la pacienţii incluşi în studiul prezentat.

În studiul lui Coladonato, efectuat pe 33080 de pacienţi urmăriţi timp de 5 ani (în perioada 1994-1998) în Statele Unite ale Americii, se semnala că durata crescută de supleere a funcţiei renale se asociază cu un Ht crescut şi/sau o responsivitate mai bună la EPO (10). Acest lucru nu se verifică însă în lotul nostru, durata mare de supleere a funcţiei renale generând hipo- sau nonresponsivitatea la tratamentul cu EPO.

CONCLUZII

1. Nu există o diferenţă biologică legată de sexul pacienţilor în ceea ce priveşte răspunsul la EPO în lotul nostru.

2. Valoarea medie a Hb în lotul nonresponderilor este de 8,44 g/dl, în timp ce în lotul responderilor ea ajunge la 10,98 g/dl.

3. Osteodistrofia renală şi malnutriţia protein-calorică sunt factori care contribuie la limitarea răspunsului anemiei renale la tratamentul cu EPO.

4. Pacienţii cu vârsta medie de intrare în dializă mai mare de 13 ani, sau cei cu o durata mai mare de 21 de luni de supleere a funcţiei renale se regăsesc în lotul nonresponderilor.

BIBLIOGRAFIE

1. Jabs K, Harmon WE. Potential use of erythropoetin in the pediatric population. In: Garnick MB editor. *Erythropoetin in Clinical Applications*. Marcel Dekker Inc, 1990.
2. Gaweda AE. Intelligent control for management of renal anemia. Challenges in dynamic treatment regimes and multistage decision-making. *University of Louisville,* Department of Medicine June 21, 2007
3. Ifudu O. Patient characteristics determining rHuEPO dose requirements. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 38-41.
4. Frankenfield DL, Rocco MV, Frederick PR, Pugh J, McClellan WM, Owen WF Jr. Racial vs ethnic analysis of selected intermediate outcomes for hemodialysis patients: results from the 1997 ESRD Core Indicators Project. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 721-730.
5. Ifudu O, Uribarri J, Rajwani I et al. Gender modulates responsiveness to recombinant erythropoietin. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 518-522.
6. Richardson D. Clinical factors influencing sensitivity and response to erythropoetin. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 53-59.
7. Brancaccio D, Cozzolino M, Gallieni M. Hyperparathyroidism and Anemia in Uremic Subjects: A Combined Therapeutic Approach. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 21-24.
8. Kimata N, Akiba T, Pisoni RL et al. Mineral metabolism and hemoglobin concentration among haemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 927-935.
9. Tonelli M, Blake PG, Muirhead N. Predictors of erythropoietin responsiveness in chronic hemodialysis patients. *ASAIO J* 2001; 47: 82-85.
10. Kalantar-Zadeh K, McAllister CJ, Lehn RS et al. Effect of malnutrition-inflammation complex syndrome on EPO hyporesponsiveness in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42 (4): 761-773.
11. Coladonato JA, Frankenfield DL et al. Trends in Anemia Management among US Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1288-1295.

NOUTĂŢI

DITERPENE CITOTOXICE CU STRUCTURĂ DE TIP ENT-ABIETAN DIN *GELONIUM AEQUOREUM*

Specia *Gelonium aequoreum* (*Euphorbiaceae*) este originară din Taiwan. În încercarea de a identifica noi substanţe cu acţiune antitumorală, Lee et al. au izolat 17 diterpene cu structura de tip ent-abietan dintr-o fracţiune extractivă diclormetanică obţinută din frunze de *Gelonium aequoreum*: gelomulidele A, G, K-X. Studii *in vitro* au evaluat citotoxicitatea acestor compuşi faţă de mai multe linii celulare tumorale. Dintre toţi compuşii testaţi, gelomulidele K şi M au dovedit citotoxicitate moderată faţa de linii celulare de cancer pulmonar (A549), cancer de sân (MDA-MB-231 şi MCF7) şi hepatic (HepG2) (Lee C-L, Chang F-R, Hsieh P-W et al. Cytotoxic ent-abietane diterpenes from *Gelonium aequoreum*. *Phytochemistry* 2008; 69: 276-287).

Anca Miron

MENINGITA CU *CRYPTOCOCCUS* SPP. CINCI ANI DE EXPERIENŢĂ ŞI REVISTA LITERATURII

Olivia Dorneanu[1], Olga Filip[2], Egidia Miftode[2], Irina Radu[1], Cristina Nicolau[2], Ioana Damian[2], V. Luca[1]

Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Disciplina de Microbiologie
2 Spitalul Clinic de Boli Infecţioase "Sf. Parascheva" Iaşi

CRYPTOCOCCUS MENINGITIS, FIVE YEARS OF EXPERIENCE AND LITERATURE REVIEW (Abstract): The aim of this study was to determine the distribution and antifungal susceptibility profile of *Cryptococcus* spp. isolated from patients in northeast Romania. **Material and method**: Fungi isolated from blood and cerebrospinal fluid (CSF) cultures were identified by ID32C strips (bioMerieux, France). Susceptibility testing was performed using ATB FUNGUS2 strips (bioMerieux, France). **Results**: A total of 20 significant strains have been isolated. Overall, *Cryptococcus neoformans* was the most frequent isolate (95%). We mention the first *Cryptococcus albidus* meningitis in Romania (strain with multiple resistance). All cryptococci tested were susceptible to amphotericin B with minimal inhibitory concentration (MIC) =1 μg/mL; 90% strains were susceptible to flucytosine. Resistance to fluconazole and itraconazole was observed in 2 and 1 case, respectively. Most of the patients had an associated infection, tuberculosis in 37.5% cases. Despite appropriate therapy 4 patients died (21%). **Conclusion**: First choice induction therapy with amphotericin B plus flucytosine followed by fluconazole is highly recommended since resistance to antifungal agents is still very low. **Key words**: CRYPTOCOCCUS, MENINGITIS, AIDS PATIENT

Criptococoza este o infecţie oportunistă severă care apare în variate condiţii de imunosupresie. Indivizii infectaţi decedează de obicei prin meningită sau meningoencefalită produsă de diseminarea fungilor în creier (1).

Cryptococcus este principala cauză de infecţii fungice oportuniste şi deces la pacienţii cu SIDA. Pacienţii cu criptococoză şi dovada serologică a infecţiei cu HIV sunt consideraţi a avea SIDA. La majoritatea pacienţilor HIV-infectaţi această infecţie este primul indicator al SIDA, în multe cazuri diagnosticul infecţiei criptococice precedându-l pe cel al infecţiei HIV. Deşi infecţia cu *Cryptococcus neoformans* debutează la nivelul plămânilor, morbiditatea şi mortalitatea sunt asociate cu infecţiile sistemului nervos central (2). *Cryptococcus neoformans* este cea mai frecventă specie a genului care produce infecţii la om. Criptococii non-neoformans au fost în general consideraţi saprofiţi şi raportaţi rareori ca patogeni umani (3).

Această infecţie apare în alte cazuri de imunosupresie şi, în aceste cazuri, diagnosticul este adeseori întârziat. Din ce în ce mai frecvent specii fungice considerate saprofite apar ca agenţi etiologici ai infecţiilor la gazda imunocompromisă.

MATERIAL ŞI METODE

Am studiat retrospectiv 20 pacienţi cu meningită criptococică, 18 pacienţi HIV-pozitivi şi 2 pacienţi HIV-negativi, internaţi în Spitalul Clinic de Boli Infecţioase „Sf. Parascheva" Iaşi între 01.2002 şi 12.2006.

Diagnosticul s-a bazat pe:

- examenul microscopic al preparatului nativ din lichid cefalo-rahidian (LCR) şi al sedimentului LCR colorat cu albastru de metilen;
- cultura pe mediu Sabouraud a sedimentului LCR;
- identificarea izolatelor pe galerii mini-API ID 32C sau API Candida (bioMérieux, Franţa);
- antifungigrama a fost realizată pe galerii miniAPI ATB FUNGUS 2 INT (bioMérieux, Franţa).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La 45% dintre pacienţii HIV-pozitivi criptococoza este prima boală definitorie asociată cu SIDA. La 5 dintre pacienţii incluşi în studiu, diagnosticul infecţiei HIV a urmat diagnosticului meningitei criptococice. Meningita criptococică a apărut la, în medie, 5 ani de la diagnosticul infecţiei HIV.

Agentul etiologic a fost *C. neoformans* în 19 cazuri şi *C. albidus* în 1 caz. Prezentăm primul caz de meningită cu *Cryptococcus albidus* în România, apărut la un pacient cu SIDA şi tuberculoză generalizată. În ciuda tratamentului cu fluconazol, pacientul a decedat.

Vârsta pacienţilor a variat între 14 şi 64 ani, cu o medie de 28,5 ani; 38,8% pacienţi au fost de sex feminin, 61,2% de sex masculin. Numărul limfociteleor CD_4 la pacienţii HIV-pozitivi a variat între 1 şi 217 per mm^3, cu o medie de 76 CD_4/mm^3.

Toţi pacienţii HIV-pozitivi au avut măcar încă o infecţie asociată (tuberculoză cu diverse localizări: ganglionară, pulmonară, pericardică, meningeană - 37,5% din cazuri; meningită meningococică; lues; toxoplasmoză; hepatită; pneumonie lobară acută; candidoză oro-faringiană; tricofiţie; herpes peribucal).

La pacienţii HIV-pozitivi, intensitatea reacţiei inflamatorii în LCR a variat între 19 şi 480 elemente celulare nucleate (ecn) per mm^3 (în medie, 121 ecn/mm^3). Parametri biochimici ai LCR la aceiaşi pacienţi: albuminorahie între 0,35-3,5 g/L (în medie 1,56 g/L), glicorahie între 0,20-0,66 g/L (în medie 0,34 g/L), clororurahie 6,40-7,70g/L (în medie 6,91 g/L). Examenul microscopic direct a fost pozitiv în 14 din cazurile studiate (77,7%).

La pacienţii cu SIDA levura poate fi izolată din LCR, sânge sau urină, iar antigenele capsulare pot fi detectate în titruri mari în ţesuturi, chiar după tratament antifungic (6).

Identificarea genului *Cryptococcus* în probele de LCR a fost posibilă prin:

- observarea de levuri rotunde sau ovalare cu o singură înmugurire şi o bază îngustă de implantare, prezentând o capsulă de grosime variabilă;
- apariţia unor colonii mucoide, variat colorate (bej, brun);
- levuri non-fermentative;
- producere de urează, utilizarea diferiţilor carbohidraţi (diferenţierea speciilor de *Cryptococcus*).

În genul *Cryptococcus* sunt incluse levuri răspândite ubicvitar, în sol şi în excrementele de păsări. Până de curând, numai *C. neoformans*, cu cele două variante *neoformans* şi *gatii*, a fost considerat patogen pentru om, alte specii (*C. albidus* şi *C. laurentii*) fiind rareori implicate în infecţii umane, după izolare din produse patologice normal sterile (3).

Cryptococcus neoformans este o levură (anamorfa bazidiomicetului *Filobasidiella neoformans*) uzual sferică, cu diametrul de 5-10 micrometri, cu una sau mai multe înmuguriri; caracteristic prezintă capsulă, de dimensiuni variabile, care conferă caracterul mucos al coloniilor. Majoritatea tulpinilor produc o capsulă groasă în cursul

infecţiilor (4). Pe baza polizaharidului capsular, prin reacţii cu antiseruri specifice de tip, au fost descrise 5 serotipuri: A-D şi AD (4,5).

Diferenţierea de alte levuri se face pe baza prezenţei şi aspectului capsulei (*C. neoformans* fiind singura specie fungică patogenă capsulată) (5), a rarei prezenţe a pseudohifelor şi prin teste biochimice. Toate speciile de *Cryptococcus* sunt nefermentative, hidrolizează amidonul, asimilează inozitolul şi produc urează. Spre deosebire de majoritatea speciilor, *C. neoformans* creşte la 37°C, mai lent şi este inhibat la temperaturi între 39-41°C şi pH alcalin (4).

Criptococoza este o infecţie sporadică cu distribuţie cosmopolită. La om infecţia apare prin inhalarea levurilor (bazidiospori) aerosolizate din excrementele păsărilor sau din sol. Nu a fost raportată transmiterea interumană sau izbucniri epidemice care să implice mai mulţi pacienţi infectaţi în acelaşi timp sau loc, prin expunere la o aceeaşi sursă. În ciuda faptului că levura este ubicvitară, rata infecţiilor este mică, factori de protecţie fiind imunitatea celulară şi sistemul fagocitic. Studii serologice restrânse au arătat că majoritatea persoanelor imunocompetente posedă anticorpi specifici (4). Infecţii apar la pacienţi cu deficienţe ale imunităţii celulare (infecţie HIV, tratament extensiv cu corticosteroizi, transplant de organ, leucemii acute, limfoame, sarcoidoză) sau chiar la pacienţi aparent imunocompetenţi (6). Patogenitatea pare să fie condiţionată de producerea fenoloxidazei, prezenţa capsulei (5) şi capacitatea de a creşte la 37°C (4). La gazda imunocompromisă, infecţia pulmonară este urmată de diseminarea hematogenă a levurii şi invadarea sistemului nervos central (7).

Răspunsul imun eficient este cel celular, anticorpii specifici nefiind protectori, dar putând funcţiona ca opsonine sau ca mediatori ai citotoxicităţii celulare anticorp-dependente. Persoane cu deficienţe în imunitatea mediată celular, cum sunt pacienţii cu SIDA, sunt mai predispuşi la criptococoză diseminată, subliniind importanţa imunităţii mediate celular şi a limfocitelor T CD4+ în rezistenţa gazdei împotriva *C. neoformans* (2).

Conform rezultatelor antifungigramei efectuate pe galerii miniAPI Fungus 2, 90% dintre tulpini au fost sensibile la flucitozină (CMI între <0,5 µg/mL şi 16 µg/mL), 100% sensibile la amfotericină B (CMI între <0,5 µg/mL şi 1 µg/mL), 90% sensibile la fluconazol (CMI între <0,25 µg/mL şi 16 µg/mL), 95% sensibile la itraconazol (CMI între <0,125 µg/mL şi 8 µg/mL). Tulpina de *C. albidus* a fost multirezistentă la antifungice (sensibilă doar la amfotericină B).

Opţiunile terapeutice în terapia infecţiilor cu *Cryptococcus* spp. includ flucitozină, amfotericină B şi derivaţi azolici. Asociaţia amfotericină B-flucitozină are avantajul sterilizării mai rapide a LCR şi al nefrotoxicităţii reduse. Fluconazolul este utilizat în schemele de întreţinere pentru prevenirea recăderilor. Totuşi recăderile sunt frecvente, fie prin eşecul sterilizării infecţiei iniţiale, fie prin reinfecţie (8). Dacă statusul imun din timpul infecţiei criptococice rămâne nemodificat, eradicarea levurii cu schemele antifungice actuale este irealizabilă (4).

După tratament iniţial cu fluconazol, recăderile meningitei criptococice simptomatice sunt asociate frecvent cu rezistenţa la fluconazol. Acest lucru se adaugă la îndoiala privind eficacitatea fluconazolului comparativ cu amfotericina B pentru tratamentul iniţial al meningitei criptococice la pacienţi HIV-pozitivi (9).

TABELUL I

CMI_{50} şi CMI_{90} pentru flucitozină (5FC), amfotericină B (AMB), fluconazol (FCA) şi itraconazol (ITR) faţă de *Cryptococcus neoformans*

	5FC	AMB	FCA	ITR
CMI_{50}	0,5 µg/mL	< 0,5 µg/mL	1 µg/mL	< 0,125 µg/mL
CMI_{90}	4 µg/mL	0,5 µg/mL	2 µg/mL	0,125 µg/mL

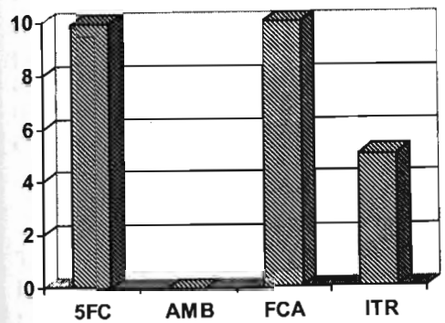


Fig. 1. **Incidenţa rezistenţei la antifungice a *Cryptococcus* spp.**

În ciuda tratamentului prompt instituit cu amfotericină B şi fluconazol, rata decesului a fost de 22,2%. Doi pacienţi au prezentat reinfecţii cu tulpini sensibile la fluconazol (după tratamentul cu fluconazol al primului episod de meningită criptococică), ambii la 5 luni de la primul episod de meningită cu *C. neoformans*.

CONCLUZII

Semnalăm infecţia emergentă cu *Cryptococcus albidus*. Tulpina de *C. albidus* izolată a fost multirezistentă la antifungice. Este posibil ca infecţiile cu alte specii de *Cryptococcus* decât *C. neoformans* să fie subdiagnosticate.

Reinfecţiile cu *C. neoformans* se datorează nivelului scăzut de limfocite CD_4.

Existenţa tulpinilor de *Cryptococcus* rezistente la antifungice şi posibilitatea dobândirii rezistenţei în timpul terapiei de prevenire a recurenţei meningitei criptococice la pacienţi cu SIDA impune testarea sensibilităţii tulpinilor izolate. Este recomandată terapia de inducţie cu amfotericină B şi flucitozină, urmată de tratament cu fluconazol.

BIBLIOGRAFIE

1. Zhou Q, Murphy WJ. Immune response and immunotherapy to *Cryptococcus* infections. *Immunol Res* 2006; 35 (3): 191-208.
2. Uicker WC, McCracken JP, Buchanan KL. Role of CD4+ T cells in a protective immune response against Cryptococcus neoformans in the central nervous system. *Med Mycol* 2006; 44 (1): 1-11.
3. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Kiratisin P, Mundy LM, Bailey TC. Evaluation of cryptococcus laurentii meningitis in a patient with HIV infection: a case report and review of the literature. *Hawaii Med J* 2006; 65 (9): 260-263.
4. Mitchell TR, Perfect JR. Cryptococcosis in the era of AIDS - 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515-548.
5. Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 469-488.
6. Bretaudeau K, Eloy O, Richer A et al. Cryptococcal meningo-encephalitis in an apparently immunocompetent patient. *Rev Neurol (Paris)* 2006; 162 (2): 233-237.
7. Chretien F, Lortholary O, Kansau I, Neuville S, Gray F, Dromer F. Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *J Inf Dis* 2002; 186: 522-530.
8. Sullivan D, Haynes K, Moran G, Shanley D, Coleman D. Persistance, replacement and microevolution of *Cryptococcus neoformans* strains in reccurent meningitis in AIDS patients. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1739-1744.
9. Bicanic T, Harrison T, Niepieklo A, Dyakopu N, Meintjes G. Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis after initial fluconazole monotherapy: the role of fluconazole resistance and immune reconstitution. *Clin Infect Dis* 2006; 43 (8): 1069-1073.

INFECŢIE CUTANATĂ PERSISTENTĂ ŞI RECURENTĂ CU *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* METICILINO-REZISTENT, VARIANTA CU COLONII MICI

Gabriela Coman[1], Nicoleta Mardare[2], Brînduşa Copăcianu[3], Maria Covic[2]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Spitalul Clinic "Dr. C.I. Parhon" Iaşi
1 Laboratorul de Microbiologie
Facultatea de Medicină
2 Clinica de Nefrologie
3 Disciplina de Microbiologie

PERSISTENT AND RECURRENT SKIN INFECTION WITH SMALL-COLONY VARIANT METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (Abstract): *S. aureus* is one of the problematic bacteria, capable to develop resistance mechanisms to all antibiotics that the bacteria are naturally susceptible. A particular phenotypic mechanism, especially against the antibiotics that repressed the synthesis of the cellular wall and aminoglycosides, was evidenced in subpopulations that grows in small-colonies and represents auxotrophic mutants for hemin, menadione or thymidine. This type of strains has been isolated most frequently from patients with osteomyelitis, septic arthritis or pulmonary infections after a long period of antibiotic treatment. The authors present the case of a patient with persistent and recurrent staphylococcal infection of the peritoneal dialysis exit site, treated with different antibiotics (ciprofloxacin, vancomicin, amoxicillin and clavulanic acid, cephalexin) from witch has been isolated a small-colony strain of methicillin-resistant *S. aureus*. Therapeutic failure can be explain by the slow multiplication of this strain *in vivo*, persistence into phagocytes and the protection offered by biofilm from the surface of the catheter. Bacteriologic diagnosis in these cases is difficult because of the culture, biochemical and susceptibility testing particularities of these strains. All these may lead failure to identification small colony variants of *S. aureus* and misevaluation of the frequency of infection with these strains in patients with long-term antibiotherapy. **Key words**: SKIN INFECTION, SMALL-COLONY VARIANT *S. AUREUS*, BACTERIOLOGIC DIAGNOSIS

S. aureus se remarcă prin diversitatea infecţiilor comunitare sau nosocomiale pe care le determină şi multitudinea mecanismelor de rezistenţă pe care le dezvoltă faţă de antibiotice la care această specie este natural sensibilă. Un mecanism fenotipic particular faţă de antibiotice care acţionează în faza de multiplicare activă a fost pus în evidenţă la subpopulaţii care cultivă mai lent sub formă de colonii mici, selectate prin expuneri anterioare la agenţi terapeutici (1,2,3). Astfel de tulpini au fost mai frecvent izolate de la bolnavi cu osteomielite, artrite septice sau infecţii pulmonare, supuşi unor tratamente prelungite cu antibiotice (4,5,6,7,8,9). Tulpini cu colonii mici au fost descrise şi la unele specii din familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Brucella abortus* (1,2,10,11). Aceste variante prezintă modificări metabolice ce conduc la auxotrofism pentru hemină, menadionă

sau timidină.

Cazul pe care îl prezentăm este al unui pacient cu infecţie tegumentară stafilococică persistentă şi recurentă, tulpina izolată după cure repetate cu antibiotice având caractere fenotipice particulare.

PREZENTARE DE CAZ

M.M. de 39 ani, sex masculin, din Tomeşti-Iaşi, în evidenţa Centrului de Dializă Iaşi cu boală renală cronică stadiul V, se prezintă în aprilie 2006 pentru apariţia unei secreţii purulente la nivelul locului de inserţie a cateterului de dializă peritoneală. Examenul bacteriologic evidenţiază prezenţa *S. aureus*, pacientul fiind tratat pe cale orală cu ciprofloxacină (1 g/zi) timp de 4 săptămâni, concomitent cu aplicaţii locale de Bactroban. La examenul de control efectuat la sfârşitul schemei de tratament se constată persistenţa infecţiei şi, în plus, dezvoltarea unui granulom care creşte în dimensiuni în următoarele 3 săptămâni, perioadă în care pacientul primeşte vancomicină (1g/zi) asociat cu amoxicilină + acid clavulanic (2 g/zi). În aceste condiţii s-a practicat excizia chirurgicală a granulomului, cu administrarea de cefalexină (2 g/zi) timp de 4 săptămâni, cu evoluţie locală favorabilă.

În septembrie 2006, după un interval de 3 luni, pacientul se prezintă din nou în ambulatorul de dializă peritoneală cu recidivarea supuraţiei la nivelul situsului de inserţie a cateterului şi refacerea granulomului. Se reintervine chirurgical sub protecţie de ciprofloxacină (1 g/zi). Postoperator pacientul dezvoltă peritonită asociată dializei cu o tulpină de stafilococ coagulazo-negativ, pentru care primeşte schema standard de terapie cu cefpiromă, ciprofloxacină şi vancomicină (i.p.) în asociere cu fluconazol (i.v.) timp de 14 zile; în acest interval celulele inflamatorii din lichidul de dializă scad sub 100/mmc.

După o lună de la externare, revenit la control, pacientul prezintă din nou secreţie purulentă la locul de inserţie a cateterului cu reapariţia granulomului inflamator. Acesta este momentul în care însămânţarea pe geloză sânge de la nivelul leziunii s-a pozitivat după 48 ore cu o tulpină de *S. aureus* cu colonii mici. Coloniile, cu diametrul de aprox. 0,5 mm, sunt nepigmentate, nehemolitice, constituite din coci gram-pozitivi în grămezi, manito-negative. Aceste criterii preliminare de identificare ne pot orienta eronat spre o tulpină de stafilococ coagulazo-negativ, fără semnificaţie clinică. Testul coagulazei la tub cu plasmă de om a fost pozitiv însă a doua zi. Antibiograma difuzimetrică efectuată în condiţii standardizate pe geloză Mueller-Hinton nu a putut fi interpretată întrucât cultura s-a dezvoltat la 48 ore. Citirea a fost posibilă la 24 ore după suplimentarea mediului de bază cu sânge de berbec, tulpina demonstrându-se sensibilă la aminoglicozide, glicopeptide, rifampicină, linezolid şi rezistentă la penicilină, oxacilină, macrolide, tetracicline, fluorochinolone.

În aceste circumstanţe, se decide schimbarea cateterului de dializă peritoneală şi a situsului de implantare, manevră însă refuzată de pacient. Acesta primeşte în continuare, timp de 4 săptămâni, vancomicină (1g la 3 zile, i.v.) şi zilnic tratament local cu rifampicină-pulbere după toaletă cu apă oxigenată. La ultimul control din martie 2007 situaţia locală era staţionară, fiind reizolat *S. aureus* cu aceleaşi particularităţi de cultivare. De remarcat faptul că această infecţie persistentă şi recurentă stafilococică nu a progresat spre tunelul intraparietal al cateterului de dializă peritoneală.

DISCUŢII

În plus de rezistenţa la antibiotice prin mecanisme comune (degradare enzimatică, prezenţa unor ţinte de atac modificate, eflux, deviere metabolică), stafilococii pot prezenta adiţional o rezistenţă fenotipică

printr-o creştere lentă a unei subpopulaţii care prezintă o serie de caractere de cultură şi enzimatice modificate. Astfel de tulpini dezvoltă colonii cu diametrul de aproximativ 10 ori mai mic decât tulpina parentală, nehemolitice, nepigmentate, manitonegative, putând fi eronat identificate de către un microbiolog neavizat (1,2,3,4,5). Timpul de generaţie prelungit (180 min faţă de 20 min) le face dificil de testat la antibiotice prin metoda standardizată iar sensibilitatea aparentă *in vitro* este în dezacord cu persistenţa şi recurenţa supuraţiei (6,12). Studii experimentale au demonstrat o rezistenţă amplificată la agenţi antibacterieni în condiţiile în care aceste tulpini aderă la suprafaţa unui biopolimer (13). În plus, persistenţa intracelulară le oferă avantaje suplimentare de supravieţuire. Aspectele particulatre ale *S. aureus* cu colonii mici menţionate în literatură au fost remarcate la tulpina izolată de la cazul mai sus prezentat.

Comparativ cu tulpinile comune de *S. aureus*, variantele cu colonii mici produc în cantitate mai redusă unii factori de virulenţă (alfa-hemolizină, proteina A), determinând leziuni tisulare mai puţin importante (1,2,3,5,14). În acest fel, asemenea infecţii pot prezenta pentru bolnav unele avantaje clinico-evolutive. Referindu-ne la cazul nostru, infecţia stafilococică a situsului de inserţie a cateterului de dializă avea toate şansele să progreseze spre o peritonită prin neîndepartarea cateterului colonizat dar această complicaţie nu a survenit într-un interval de peste o jumătate de an de la diagnostic. De menţionat că o scădere a gradului de patogenitate a fost remarcată la tulpini cu colonii mici aparţinând altor specii bacteriene (10).

Tratamentul optim cu antibiotice al infecţilor stafilococice cu colonii mici nu a fost bine definit (2,3,6). Asociaţia cotrimoxazol cu rifampicină, antibiotice cu bună penetrabilitate intracelulară, s-a dovedit activă în culturi de ţesuturi. A fost de asemena propusă administraea de vitamina K ce ar favoriza reversia mutantelor auxotrofe pentru menadionă spre tulpina parentală. Opţiunea pentru aceste terapii necesită cunoaşterea tipului de modificări metabolice generate prin fenomenul de mutaţie, tulpinile auxotrofe pentru timidină fiind rezistente la sulfametoxazol şi trimetroprim.

CONCLUZIE

Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor cu *S. aureus*, varianta cu colonii mici, prezintă dificultăţi legate de particularităţile de cultură, biochimice şi de testare a sensibilităţii *in vitro* la antibiotice, ceea ce poate explica o subevaluare a frecvenţei acestora. Prezenţa unor astfel de tulpini necesită a fi urmărită mai ales în infecţii cu persistenţă îndelungată, refractare la tratamente prelungite cu agenţi antibacterieni.

BIBLIOGRAFIE

1. Proctor RA, Bates DM, McNamara PJ. Electron transport-deficient *Staphylococcus aureus* small-colony variants as emerging pathogens. In : Scheld WM, Craig WA, Hughes JM editors. *Emerging Infections* 5. Washington D.C. : ASM Press, 2001, 95-110.
2. Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistamce. *Clin Infect Dis* 1998 ; 27 (Suppl 1) : 68-74.
3. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections : diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis* 1988 ; 27 : 419-423.
4. Kahl B, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters B. Thymidine -dependent small colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impired cell separation. *J Clin Microbiol* 2003 ; 41 : 410-413.

5. Kahl B, Herrmann M, Everding AS et al. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 1988 ; 177 : 1023-1029.
6. Spanu T, Roman L, D'Inzeo T et al. Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection caused by small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2005 ; 41 : 48-52.
7. Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, von Eiff C. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 1316-1318.
8. Seifert H, von Eiff C, Fatkenheuer G. Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis* 1999 ; 5 : 450-453.
9. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomielitis. *Clin Infect Dis* 1997 ; 25 : 1250-1251.
10. Cano DA, Pucciarelli MG, Martinez-Moya M, Casadesus J, Garcia-del Portillo F. Selection of small-colony variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in nonphagocytic eucaryotic cells. *Infect Immunol* 2003 ; 71 : 3090-3098.
11. Roggenkamp A, Sing A, Hornef M, Brunner U, Autenrieth IB, Heesemann J. Chronic prosthetic hip infection caused by small-colony variant of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1988 ; 36 : 2530-2534.
12. Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2004 ; 42 : 1277-1279.
13. Chuard C, Vaudaux PE, Proctor RA, Lew DP. Decreased susceptibility to antibiotic killing of a stable small colony variant of *Staphylococcus aureus* in fluid phase and on fibronectin-coated surfaces. *J Antimicrob Chemother* 1997 ; 39 : 603-608.
14. Sifri CD, Baresch-Bernal A, Calderwood SB, von Eiff C. Virulence of *Staphylococcus aureus* small colony variants in the *Caenorhabditis elegans* infection model. *Infect Immunol* 2006 ; 74 : 1091-1096.

NOUTĂŢI

CONSECINŢE ALE INTERVENŢIEI NUTRIŢIONALE ÎN PRIMII ANI DE VIAŢĂ ASUPRA PRODUCTIVITĂŢII ECONOMICE LA ADULŢI

Există dovezi concrete care, deşi indirecte, sugerează că în ţările în curs de dezvoltare o îmbunătăţire a alimentaţiei în perioada primilor şapte ani de viaţă reprezintă o investiţie pe termen lung. Autorii au analizat date de natură economică provenite de la 1424 persoane din Guatemala, cu vârste cuprinse între 25–42 de ani, între anii 2002-2004. Aceste persoane adulte reprezintă 60% dintre cei 2392 copii antepreşcolari şi preşcolari care au fost incluşi într-un program de supraveghere a nutriţiei între anii 1969-1977. În acest studiu au fost iniţial incluse câte două comunităţi din mediul rural, alese la întâmplare, în care au fost folosite sau excluse anumite suplimente nutriţionale. În acelaşi timp, a fost evaluat venitul anual, numărul de ore lucrate şi venitul mediu pe oră rezultat din toate activităţile. Folosind modele de regresie liniară autorii au încercat să determine relaţiile dintre variabilele de ordin economic şi durata de expunere la cele două tipuri de alimentaţie, de la naştere şi până la vârsta de 7 ani. Includerea de suplimente în primii trei ani de viaţă, dar nu şi după, s-a asociat cu niveluri mai crescute pentru câştigul pe oră doar la bărbaţi. O suplimentare în primii 2 ani de viaţă a dus la o creştere a venitului cu 0,67 USD/oră (95% CI 0•16–1•17), ceea ce reprezintă o variaţie procentuală a venitului de 46%. Nu au fost identificate tendinţe semnificative de reducere a numărului de ore lucrate, respectiv de creştere a venitului anual la cei care în primii doi ani de viaţă au primit suplimente nutriţionale. În concluzie, ameliorarea alimentaţiei în primii ani de viaţă duce la creşteri substanţiale pentru nivelurile de câştig salarial la bărbaţi şi sugerează că investiţia în acest sens poate fi, pe termen lung, un element de creştere economică (Hoddinott J, Maluccio JA, Behrman JR, Flores R, Martorell R. Effect of a nutrition intervention during early childhood on economic productivity in Guatemalan adults *Lancet* 2008 ; 371 : 411-416).

F.D. Petrariu

DOZAREA GAMA-INTERFERONULUI ÎN SÂNGE ŞI ÎN LICHID CEFALORAHIDIAN - METODĂ RAPIDĂ DE DIAGNOSTIC A MENINGITEI TUBERCULOASE

Mihaela Cătălina Luca[1], Cristina-Mirela Petrovici[2], A. Vâţă[1], Carmen Dorobăţ[1], E. Năstase[1], V. Luca[1], Andra Teodor[1], A. Luca[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea deMedicină
1 Clinica de Boli Infecţioase Iaşi
2 Spital Clinic de Boli Infecţioase Iaşi

GAMMA INTERFERON TESTING IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID - RAPID METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF TUBERCULOUS MENINGITIS (Abstract): **Aim**: To evaluate the benefit of this early method of diagnosis of tuberculous meningitis, gamma-interferon levels comparatively in blood and cerebrospinal fluid (CSF). **Material and method**: We have studied 50 patients with tuberculous meningitis admitted in the Clinic of Infectious Diseases Iaşi between 2006-2007, from the epidemiological, clinical, diagnosis and therapeutical points of view. **Results**: Tuberculous meningitis was more frequent in males, with a mean ration of 2.5. The age of patients varied between 2 and 78 years of age, with a mean value of 30.5 years. 35.6% of patients were children. In 32 cases the meningean infection was secondary, disseminated from a primary site, most frequently from the lungs (68,7%). The bacteriologic confirmation was through culture in 13.3%, with an average of 23.4 days of incubation. In whole blood the sensitivity Quantiferon TB Gold assay (QTF) was 78.57%. In CSF the specificity was higher than in blood (96.1 vs. 88.4%), having a positive prediction value over 90%. Antituberculous therapy prior to QTF testing had a negative impact, 50 to 6 cases having negative QTF results. **Conclusion**: The performance indicators of TB Gold Quantiferon Test in serum or CSF are high, being more sensitive and rapid than the direct exam of CSF or BK culture. **Key words**: GAMMA-INTERFERON, TUBERCULOUS MENINGITIS, CEREBROSPINAL FLUID

Studiul infecţiei tuberculoase la nivel mondial şi în România arată o reemergenţă a bolii, în special a meningitei tuberculoase, datorată pandemiei infecţiei HIV, cât şi problemei multirezistenţei tulpinilor de bacil Koch, precum şi gravităţii deosebite a meningitei tuberculoase.

Scopul lucrării a fost diagnosticul precoce al meningitei tuberculoase în vederea instituirii unui tratament eficient al acestei boli, uneori cu prognostic vital rezervat.

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost studiate retroprospectiv foile de observaţie ale pacienţilor diagnosticaţi cu meningită bacilară în Clinica Boli Infecţioase Iaşi în perioada 2006-2007. Au fost analizate variabile: demografice, epidemiologice (provenienţa din focar, contacte cu alţi bolnavi, antecedente de tuberculoză), clinice (debut, simptomatologie la internare) şi paraclinice. Dintre examenele paraclinice: cele imagistice (RM, CT cranian), examene hematologice şi biochimice, intradermoreacţia la tuberculină şi studiul citologic, biochimic şi microbiologic al lichidului cefalorahidian precum şi dozarea gama-interferon în sânge şi LCR (testul Quanti-

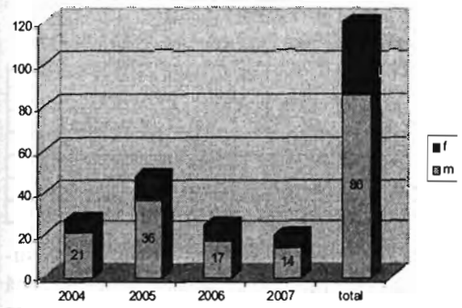


Fig. 1. Raportul masculin / feminin

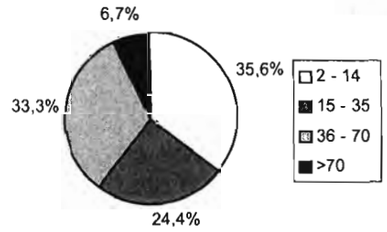


Fig. 2. Distribuţia pe grupe de vârstă a pacienţilor

feron TB gold).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Studiul a cuprins 50 de pacienţi cu meningită tuberculoasă, boala fiind mai frecventă la sexul masculin, raportul dintre sexe fiind în medie de 2,5 (fig. 1). Vârsta pacienţilor internaţi a variat între 2 şi 78 de ani, fiind în medie de 30,5 ani (mediana 29 ani) (fig. 2). S-a remarcat procentul ridicat de copii în lotul studiat (35,6%), iar 40% pacienţi au avut vârste peste 36 ani. La 71,1% dintre pacienţi (32 cazuri) meningita a fost secundară, diseminată de la un focar primar. Cel mai frecvent (68,7%) focarul primar a fost pulmonar.

Diagnosticul clinic al meningitei tuberculoase s-a realizat prin evidenţierea semnelor şi simptomelor, 93.3% pacienţi au prezentat unul sau mai multe semne de "impregnare bacilară". 31,1% pacienţi erau în comă, debutul bolii fiind insidios în majoritatea cazurilor.

Sindromul de contractură meningiană a fost prezent de la internare la 75,6% pacienţi, iar în restul cazurilor fiind doar schiţat. Convulsii tonico-clonice generalizate au fost prezente la 13 pacienţi (11 în cadrul comei meningiene).

Diagnosticul de laborator s-a realizat prin examenul lichidului cefalorahidian la toţi pacienţii, LCR-ul recoltat fiind analizat din punct de vedere citologic, biochimic, microbiologic şi, în 20 de cazuri, prin testul Quantiferon TB gold.

Constantele LCR sunt prezentate în tabelul I.

Examenul direct în coloraţie Zhiel-Nielsen a evidenţiat bacili acido-alcoolorezistenţi la 1 pacient (2,2%).

Cultura pe mediul Lowenstein Jensen a condus la confirmarea bacteriologică a diagnosticului în doar 6 cazuri (13,3%). Intervalul mediu necesar cultivării *Mycobacterium tuberculosis* a fost de 23,4 zile.

În restul cazurilor, diagnosticul a fost susţinut de tabloul clinic, celularitatea şi constantele biochimice ale LCR, de existenţa unor alte focare de infecţie tuberculoasă şi de evoluţie favorabilă sub tratament tuberculostatic.

Intradermoreacţia la tuberculină s-a practicat la internare la toţi bolnavii investigaţi şi la un lot de 28 de pacienţi cu alte afecţiuni (meningite limfocitare, bacteriene sau cu absenţa reacţiei inflamatorii în LCR). Citirea s-a realizat la 72 de ore. Au fost excluşi cei 3 pacienţi cu SIDA. Au fost pozitivi (induraţie peste 10mm) 34 de pacienţi cu meningită tuberculoasă şi 8/28 de pacienţi fără infecţie tuberculoasă activă,

TABELUL I

Analiza citologică şi biochimică a LCR

	Media	95%CI of Mean	
Nr. Celule	302.550	173.092	to 432.008
%limfocite	80.600	72.903	to 88.297
Albuminorahie	2.657	1.479	to 3.835
Glicorahie	0,290	0,238	to 0,441
Clororahie	6.700	6.209	to 7.091

TABELUL II

Rezultatele testului Quantiferon TB Gold în ser

Quantiferon Ser				
	Meningita TB		Martori non - TB	
Rezultat	*Nr. cazuri*	*%*	*Nr.cazuri*	*%*
Pozitiv	11	64,71	3	10,71
Nedeterminat	3	17,65	2	7,14
Negativ	3	17,65	23	82,14
Total	17	100	28	100

TABELUL III

Rezultatele testului Quantiferon TB Gold în LCR

Quantiferon LCR				
	Meningita TB		Martori non - TB	
Rezultat	*Nr. cazuri*	*%*	*Nr.cazuri*	*%*
Pozitiv	10	58,82	1	3,57
Nedeterminat	1	5,88	1	3,57
Negativ	6	35,29	26	92,85
Total	17	100	28	100

sensibilitatea testului fiind de 71,4%, iar specificitatea de 62,5%.

Tratamentul tuberculostatic de primo-intenţie a fost instituit cu asocierea: Rifampicină, Isoniazidă, Etambutol şi Pirazinamidă, în administrare zilnică, la 82.2% dintre cazuri; la pacienţii cu tulburări ale stării de conştienţă administrându-se dexametazonă.

Letalitatea a fost de 17,8%, 8 dintre pacienţii urmăriţi decedând (5 în prima săptămână de la iniţierea terapiei şi 3 după 7 zile de tratament).

Ca şi metodă de diagnostic a meningitei tuberculoase, testul Quantiferon TB Gold în sânge sau LCR a fost mult mai sensibil faţă de examenul direct al LCR sau cultura BK. Sensibilitatea testului în ser a fost superioară intradermoreacţiei la tuberculină (78,57% versus 71.4%), iar specificitatea testului Quantiferon a fost deosebit ridicată, mai mare în LCR faţă de ser (96,1% versus 88,4%).

CONCLUZII

Rezultatul testului în LCR are o valoare predictivă de peste 90% pentru meningita tuberculoasă. Testul Quantiferon TB Gold prezintă o serie de avantaje prin raportul preţ-performanţă fiind o metodă relative rapidă ce oferă rezultate în circa 48 ore, permiţând instituirea precoce a tratamentului specific cu ameliorarea importantă a prognosticului bolii.

BIBLIOGRAFIE

1. Andresen P. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-1104.
2. Mazurek GH, Weiss SE, Moonan PK et al. Prospective comparison of the tuberculin skin test and 2 whole-blood interferon-gamma release assays in persons with suspected tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 45 (7): 837-845.
3. Jones S, deGijsel D, Wallach FR, Gurtman AC, Shi Q, Sacks H. Utilitz of Quantiferon-TB Gold in-tube testing for latent TB infection in HIV-infected individuals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11 (11): 1190-1195.
4. Kobashi Y, Mouri K, Zagi S et al. Clinical utilitz of Quantiferon-TB 2 test for elderly patients with active tuberculosis. *Chest* 2008; e-pub ahead of print.
5. Munk ME. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2001; 183: 175-176.
6. Okada K, Mao TE, Mori T et al. Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis in children. *Epidemiol Infect* 2007; 8: 1-9.
7. Ravn P. Human T cell responses to ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999; 179: 637-645.
8. Torok ME, Nghia HD, ChauTT et al. Validation of a diagnostic algorithm for adult tuberculous meningitis. *Am J Tropical Med Hyg* 2007; 77 (3): 555-59.
9. Whalen CC. Diagnosis of latent tuberculosis infection: measure of measure. *JAMA* 2005; 293: 2785-2787.
10. Yoshihiro K, Yasusihi O. Clinical reevaluation of Quantiferon-TB-2G test as a diagnostic method for differentianting active tuberculosis from nontuberculous mycobacteriosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1540-1546.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

ALGORITM TERAPEUTIC AL SCOLIOZELOR IDIOPATICE ALE COPILULUI

Ionica Ciortan[1], D.G. Goţia[2]
1 Centrul medical "IOWEMED" Constanţa
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
2 Clinica de Chirurgie şi Ortopedie Pediatrică

THERAPEUTIC ALGORITHM OF IDIOPATHIC SCOLIOSIS IN CHILD (Abstract): Acquired deformations of spinal cord (scoliosis, cifosis, lordosis) represent a frequent pathology in child; their treatment is complex, with variable results which depend on various parameters. Mild scoliosis, with an angle less than 30°, is treated with kinetotherapy and regular follow-up. If the angle is higher than 30°, the orthopedic corset is required; the angle over 45° impose surgically correction. The indications of every therapeutic method depend on many factors, the main target of the treatment is to prevent the aggravation of the curvature; concerning the surgery, the goal is to obtain a correction as normal as possible of the spinal axis. **Key words**: SCOLIOSIS, KINETOTHERAPY, ORTHOPEDIC CORSET

Deşi tratamentul scoliozei aparţine strict medicului ortoped, în anumite segmente ale sale îşi găsesc locul kinetoterapeutul, specialistul în confecţionarea ortezelor, medicul anestezist şi medicul de familie. Fiecare dintre aceştia trebuie să cunoască simptomatologia şi evoluţia scoliozelor precum şi posibilităţile terapeutice ţinând cont de anumiţi parametri: vârsta la care a debutat scolioza, gradul de evolutivitate, gradul curburii scoliotice, topografia, vârsta actuală cronologică şi osoasă, sexul, iar pentru fete data apariţiei primei menstruaţii.

Dintre multiplele tipuri de scolioze structurale, scolioza idiopatică este cea mai frecventă, reprezentând cam 80% din totalul scoliozelor.

Clasificarea scoliozelor idiopatice diferă după criteriul luat în consideraţie:

1. După vârsta de apariţie a curburii scoliotice Ponseti şi Cotrel (1) le împart în:

- scolioza sugarului cu debut între 0-1 an. Include două forme cu prognostic total diferit: o formă cu curbură lungă, cu rotaţie vertebrală moderată şi care este rapid regresivă; cea de a doua formă are curbura scurtă şi rigidă, cu rotaţie vertebrală marcată şi cu prognostic foarte sever.
- scolioza infantilă cu debut între 1-3 ani; formele sinistro-convexe au de obicei o evoluţie rapidă, mai ales cele au curbura scurtă.
- scolioza juvenilă apare între 4 ani şi debutul pubertăţii (în medie 12 ani la fete şi 14 ani la băieţi). Este cea mai des întâlnită şi are evoluţie variabilă.
- scolioza adolescentului debutează între vârsta pubertăţii şi maturaţia scheletală. Este mai frecvent localizată lombar şi are o evoluţie mai benignă ţinând cont de gradul mai redus de evolutivitate datorită potenţialului restant de creştere diminuat.

2. După localizare şi numărul de curburi.

3. După gradul curburii.

4. După gradul de evolutivitate. Se apreciază că o scolioză nu este evolutivă dacă la

vârsta de 15-16 ani nu depăşeşte 30° ; este evolutivă dacă depăşeşte 30° chiar la vârstă mai mică. În funcţie de aceasta se apreciază şi prognosticul :

- evoluţia cu 1° pe lună (12° pe an) semnifică o curbură malignă cu mare evolutivitate şi care necesită un tratament agresiv, cu corset ghipsat iniţial.

- evoluţia cu 6° pe an permite un tratament mai blând, folosindu-se corsetul ortopedic şi kinetoterapia.

- evoluţia cu 2° pe an permite întreruperea tratamentului şi urmărire periodică.

Cauzele instalării scoliozei idiopatice sunt multiple fiind implicaţi factori genetici, neurologici, dezordini ale metabolismului colagenului, factori endocrini.

Elementul esenţial în instalarea curburii scoliotice este începerea rotaţiei axiale (în plan orizontal) care va atrage după sine devierea vizibilă în plan frontal şi apoi în plan sagital (asocierea cifozei). În final se produce accentuarea acestor devieri de la statica normală a coloanei vertebrale, instalarea gibozităţii costale şi manifestări clinice diverse în funcţie de localizarea topografică a curburii scoliotice.

Examenul radiografic este esenţial pentru orientarea terapeutică alături de ceilalţi parametri amintiţi anterior. Radiografia permite aprecierea gradului de curbură prin metoda Cobb (cea mai folosită) sau Fergusson, amploarea rotaţiei axiale a vertebrei apicale prin metoda Nash şi Moe, valoarea curburilor în plan sagital pe radiografia de profil (cifoza dorsală şi lordoza lombară), redresabilitatea curburii scoliotice în flexie laterală maximă (testul Bending) şi evaluarea maturaţiei osoase în funcţie de gradul de osificare a crestelor iliace (testul Risser).

În cazul scoliozelor dorsale grave trebuie evaluată funcţia respiratorie prin efectuarea probelor funcţionale, precum şi funcţia cardiacă prin evaluare cel puţin electrocardiografică.

Evoluţia naturală depinde de mai mulţi factori şi de care trebuie ţinut cont în stabilirea conduitei terapeutice (2) :

1. Vârsta de apariţie trebuie coroborată cu valoarea unghiulară. O scolioză de 20° la vârsta de 5 ani este alarmantă, la 10 ani este îngrijorătoare, iar la 16 ani nu prezintă un motiv de îngrijorare (3).

2. Tipul de curbură :

- scoliozele dorsale şi dorso-lombare cu mare evolutivitate continuă să se agraveze şi în timpul vieţii adulte (3,4).

- scoliozele lombare sunt în general benigne, chiar dacă la vârsta adultă se complică cu artroză degenerativă.

- scoliozele cervicale şi cervico-dorsale evoluează cu viciu cosmetic produs de modificarea poziţiei capului.

3. Valoarea unghiulară :

- scoliozele sub 30° evoluează de obicei lent până la maturitatea osoasă când numai 52° depăşesc pragul limită de 30° (5). Totuşi evoluţia lor este imprevizibilă.

- scoliozele peste 30° evoluează toate până la maturitatea osoasă ; totuşi, un mic procent (1-2%) se pot ameliora spontan sau se pot stabiliza.

ALGORITM TERAPEUTIC

Tratamentul scoliozei idiopatice se bazează pe criteriile lui Stagnara (6) :

- supraveghere în cazul curburilor mai mici de 30°

- tratament ortopedic în cazul scoliozelor între 30° - 50°

- tratament chirurgical pentru curburile mai mari de 50°.

Tratamentul ortopedic nu poate avea pretenţia de a duce la remisiunea completă a scoliozei cu o mobilitate normală şi simetrică a coloanei vertebrale. Totuşi, el este considerat eficient dacă la maturitatea scheletală unghiul de curbură rămâne acelaşi cu cel iniţial, cu variaţie de ± 5° (7). Prin tratament ortopedic sau conservator se înţelege kinetoterapia şi ortezarea.

O scolioză cu curbura sub 20° beneficiază numai de kinetoterapie, care însă are doar un rol de susţinere a forţei musculare şi a posturii, nu un mijloc de tratament de sine stătător. O asemenea scolioză surprinsă înainte de maturaţia scheletală este urmărită radiologic la 6 luni, iar după maturaţia scheletală nu mai are sens această urmărire. O scolioză peste 20° însă, înainte de maturaţia scheletală se urmăreşte radiologic la 3 luni, iar după maturaţia scheletală se urmăreşte anual dar fără nici un tratament.

Kinetoterapia combină un program de reeducare-recuperare şi vizează nu numai regiunea scoliotică a coloanei vertebrale, ci ansamblul corpului într-o manieră globală.

Ca regulă generală este indicată ca unică procedură numai în curburile uşoare, suple. În celelalte cazuri se impune tratamentul ortotic sau cel chirurgical, kinetoterapia având rol adjuvant, de prevenire a decompensărilor, de susţinere psihologică. Trebuie subliniat faptul că în scoliozele evolutive kinetoterapia nu are nici un rol, efectuată singură (8).

Tratamentul de reeducare-recuperare în scoliozele neevolutive se desfăşoară în 3 etape :

- conştientizarea de către pacient a defectelor pe care le prezintă coloana sa vertebrală şi modalităţile de a corecta poziţia incorectă. Această etapă durează între 5 şi 10 şedinţe.

- asuplizarea şi tonifierea musculaturii şanţurilor vertebrale, trunchiului şi membrelor superioare se efectuează în şedinţe zilnice pe parcursul mai multor luni.

- etapa de consolidare şi readaptare fixează rezultatele obţinute prin şedinţe zilnice.

Kinetoterapia asociată tratamentului ortotic urmăreşte consolidarea mobilităţii coloanei vertebrale şi întărirea musculaturii trunchiului prin exerciţii specifice.

După tratamentul chirurgical reeducarea pacientului începe a doua zi după intervenţie. Include reeducarea respiratorie, contracţii musculare statice (favorizarea circulaţiei perturbată de decubit), poziţionarea pacientului şi apoi aducerea progresivă la poziţia verticală.

Tratamentul ortotic îşi are indicaţia în cazul scoliozelor evolutive, între 30ş-50ş. Purtarea corsetului este limitată la vârsta instalării maturităţii scheletale. Dincolo de această vârstă nu mai are nici o utilitate.

Există o multitudine de tipuri de corsete ortopedice imaginate pentru diverse localizări topografice, vârste, corijare asociată sau nu a curburii în plan sagital.

Cele mai utilizate sunt corsetul Milwaukee şi Cheneau. Primul are indicaţie majoră în scoliozele toracice înalte şi cervico-toracice deoarece are sprijin occipital şi mentonier. Corsetul Cheneau este indicat în scoliozele toracale, toraco-lombare şi lombare.

Portul corsetului trebuie să fie permanent cu excepţia a 2 ore din 24, timp necesar toaletei corporeale şi kinetoterapiei. Nici în timpul orelor şcolare corsetul nu trebuie înlăturat. Orice abatere de la aceste reguli de purtare a corsetului poate duce la agravarea curburii scoliotice (9).

Eficienţa tratamentului ortotic ţine de corectitudinea portului corsetului, de calitatea confecţionării acestuia şi de momentul când s-a început tratamentul.

Orice scolioză a cărei curbură a trecut de 30° şi are unghiul costo-vertebral Metha mai mare de 20°, este o scolioză evolutivă şi trebuie ortezată cât mai repede. Cu cât mai târzie este ortezarea după agravarea curburii, cu atât mai slab va fi rezultatul tratamentului.

Pe de altă parte, nici folosirea corsetului la o curbură sub 30° nu este indicată, deoarece curbura poate să nu fie evolutivă, iar purtarea corsetului nu este lipsită de inconveniente fizice şi psihice.

Uneori folosirea corsetului duce la ameliorări surprinzătoare, de 10°-20° a curburii scoliotice.

Tratamentul chirurgical este indicat în scoliozele care depăşesc 45°-50°, operaţia vizând corectarea cât mai accentuată a curburii coloanei vertebrale şi stabilizarea sa prin folosirea unor implante metalice urmată de fuziunea osoasă a vertebrelor prin rezecţia articulaţiilor intervertebrale şi plasarea unei grefe osoase (10).

Implantul metalic folosit serveşte numai la redresarea deformării coloanei şi la menţinerea reducerii angulaţiei până la fuziunea completă a vertebrelor realizată de artrodezare.

Stabilirea momentului operator diferă în funcţie de mai multe criterii (11):

- unghiul curburii (măsurat prin metoda Cobb) mai mare de 50°
- testul Risser peste valoarea 3
- la fete după 1 an – 1 an şi jumătate după apariţia primei menstruaţii
- vârsta de cel puţin 13-14 ani
- agravarea rapidă a scoliozei.

Tratamentul chirurgical este grevat de o serie de complicaţii posibile, iar îngrijirile postoperatorii trebuie să fie deosebit de atente.

Orientarea tratamentului scoliozei conform acestui algoritm va duce la rezultate bune în limitele specificate şi ţinând cont de factorii de gravitate expuşi.

BIBLIOGRAFIE

1. Cotrel Y. *New Instrumentation for Surgery of the Spine*. London: Freund Publishing House Ltd, 1986.
2. Jianu M. *Tratamentul scoliozei la copil şi adolescent*. Bucureşti: Ed. Cartea Românească, 2001.
3. Goţia DG, Aprodu SG, Gavrilescu S, Savu B, Munteanu V. *Ortopedie şi traumatologie pediatrică*. Iaşi: Ed. „Gr.T. Popa", 2001: 107-140.
4. Scoles PV. *Paediatric Orthopedics in Clinical Practice*. 2nd ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1980, 1-80, 179-214.
5. Clarisse P. *Pronostic evolutif des scolioses idiopathique mineures de 10 grade a 29 grade en periode de croissance*. Lyon: These Med, 1974.
6. Stagnara P. *Les deformations du rachis: scoliozes, cyfoses, lordoses*. Paris: Masson, 1985, 169-188.
7. Jianu M, Saparescu I. *Modificările de axă ale coloanei vertebrale la copil şi adolescent*. Bucureşti: Ed. Cartea Medicală, 1998, 168-300.
8. Carlioz H, Seringe R. *Orthopedie du nouveau-ne a l'adolescent*. Paris: Masson, 2002.
9. Jianu M. *Noţiuni practice de ortopedie pediatrică de la nou-născut la adolescent*. Bucureşti: Pro Editură şi Tipografie 2006.
10. Tachdjian MO. *Paediatric Orthopedics*. 2nd ed. vol. 3. Philadelphia: WB Saunders Comp, 1990, 923-925, 2183-2404.
11. Jianu M. *Atlas color de ortopedie pediatrică*. Bucureşti: Ed. Tridona, 2003, 86, 142-194.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi – 2008 – vol. 112, nr. 1

OUTCOME OF INCIDENTAL THYROID CARCINOMA IN PATIENTS UNDERGOING SURGERY FOR GRAVES'DISEASE

R. Dănilă, E. Karakas, T. Osei-Agyemang, I. Hassan
Philipps-University Marburg
Department of Visceral, Thoracic and Vascular Surgery

OUTCOME OF INCIDENTAL THYROID CARCINOMA IN PATIENTS UNDERGOING SURGERY FOR GRAVES' DISEASE (Abstract): Thyroid malignancy detected incidentally in patients who are operated for Graves'disease (GD) has been reported at different rates. The aim of this study was to investigate the rate and outcome of incidental thyroid carcinoma in thyrotoxic GD patients managed by surgery in our institution. **Methods**: A retrospective study was performed on a consecutive series of 92 patients with GD operated between January 2000 and December 2006 in the Department of Surgery of the Philipps University, Marburg. All patients were identified via the central electronic patient registry. Incidence and outcome of thyroid carcinoma incidentally discovered in patients undergoing surgery for GD were analysed. **Results**: 82.6% were females and 17.4 were males. Mean age at time of surgery was 41.6 years (range: 12-72). Mean hospital stay was 5 days (range: 1-21). Two (2.2%) of all patients had a papillary thyroid microcarcinoma. Tumour size was 3 mm and 5 mm. Multifocality and lymph node involvement were not detected. Following thyroidectomy, the two patients are well and disease free with a follow-up of 6, respectively 3 years. **Conclusion**: The incidence of incidentally thyroid microcarcinoma was not higher in patients with GD compared to other benign thyroid disorders described in the literature. Differentiated thyroid cancer found incidentally at surgery for hyperthyroidism seems to have a good prognosis. **Key words**: THYROID, CARCINOMA, GRAVES, SURGERY.

The relationship between thyrotoxicosis and thyroid carcinoma is described in two circumstances. Although most of thyroid cancers are associated with euthyroidism, a well differentiated follicular tumour or distant metastases may cause thyrotoxicosis. More frequently is reported the condition of thyroid carcinoma detected incidentally in patients who are operated for thyrotoxicosis, with an incidence varying between 0.21 and 16.6% by several authors (1,2,3,4,5,6). Moreover, it has been suggested that thyroid cancer associated with Graves' disease takes a more aggressive course and should be treated vigorously (7). Other investigators have not confirmed this finding and the issue remains controversial (8).

We report our experience in two patients incidentally diagnosed with differentiated thyroid cancer following thyroidectomy for Graves' disease.

PATIENTS AND METHODS

A retrospective study was performed on a consecutive series of 92 patients with GD operated between January 2000 and December 2006 in the Department of Surgery of the Philipps University, Marburg. All patients were identified via the central electronic patient registry. Besides clinical and hormonal assays sugestive for hyperthyroidism, the diagnosis of Graves' disease was based on the classic criteria: thyrotoxicosis

with or without clinical ophthalmopathy, a diffuse homogeneous goiter on palpation and neck US as well as the presence of TSH receptor antibodies (TRAb) in the patient's serum. Data related to diagnosis and treatment of GD prior to admission, as well as early postoperative outcome, was collected from the medical files.

Between 2000 and 2001 unilateral lobectomy and contralateral near total lobectomy (Hartley-Dunhill) was the standard operative procedure. In selected cases of severe endocrine ophthalmopathy or pronounced immunologic activity, a total thyroidectomy was performed. Since 2001, total thyroidectomy has become the procedure of choice. All operations were performed or supervised by consultant surgeons experienced in thyroid and parathyroid surgery. Independent of the extent of resection, a standardized surgical technique was employed, mandating primary identification of the recurrent laryngeal nerve (RLN) as well as visualization and preservation of the parathyroid glands. Parathyroid autotransplantation was performed whenever their blood supply was compromised.

Early postoperative specific complications such as bleeding, transient hypocalcemia, as well as recurrent laryngeal nerve (RLN) palsy were recorded. For the purpose of this study, hypoparathyrodism was assumed in any patient requiring calcium and/or vitamin D supplementation because of clinical signs of hypocalcemia. PTH-levels were not routinely measured.

Histopathological examination of surgical specimens resulted in discovery of two papillary thyroid microcarcinoma.

The follow-up of the two patients with papillary microcarcinoma consisted of clinical examination, monitoring of serum thyroglobulin and ultrasonography, in order to detect residual disease in the thyroid gland and lymph node metastasis. No evidence for either regional lymph node or distant metastasis was recorded.

RESULTS

Between January 2000 and January 2006, 92 patients were operated on for GD. There were 76 women with a median age of 41 years (range 12-72) and 16 men with a median age of 45 years (range 24-66). The duration of postoperative follow-up was median 96 months (range 12 – 216 months).

The level of TSH-receptor antibodies (TRAb) was preoperatively measured in 89/92 patients (96.7%) and was found increased in 78/89 (88%). In 11patients (12%) the TSH-R-Ab level was within the normal range. In these patients clinical symptoms, measurement of endocrine orbitopathy and ultrasonography of the thyroid gland confirmed the suspected Graves´ disease.

33 patients had an unilateral lobectomy and contralateral near total lobectomy (Hartley-Dunhill), whereas in 59 patients a total thyroidectomy was performed. All operations were performed or supervised by surgeons with special expertise in thyroid and parathyroid surgery. No postoperative mortality was recorded. There were no perioperative thyrotoxic crises in either of the groups. Transient hypocalcemia occurred in 47 % of the patients while permanent hypocalcemia occurred in 15.3%. Postoperative bleeding required reintervention in 6 patients (6.6%). Transient RLN palsy occurred in 7.6%. Only one case of permanent RLN palsy was registered (1,1%).

In two cases (2.2%) the final pathology examination revealed a papillary thyroid microcarcinoma. In both cases the indication of total thyroidectomy was established on the diagnosis of Graves'disease. Neither the clinical picture nor the US raised the suspicion of malignancy. Nodularity of the goiter and cervical lymph node involvement were excluded by preoperative echography and intraoperative exploration. Tumour size was 3 mm and 5 mm respectively. Multifocality and lymph node involvement were not detected. Neither central nor lateral compartment lymphadenectomy was performed. The follow-up showed that both patients were well and disease free at 6, respectively 3 years postoperatively. The weight of the resection specimens was in a median of 49 g (range 35- 492 g). In cases with incidentally discovered microcarcinoma, the thyroid weighted 14 and 28 g respectively.

DISCUSSION

In this study, thyroid carcinoma was diagnosed at a rate of 2.2% after surgery for Graves' hyperthyroidism. The association of malignancy with thyrotoxicosis has been reported at different rates from different countries or different centers from the same country (1,2,3,4,5,6). The incidence of thyroid cancer associated with Graves' disease ranges between 3 and 16% according to case selection (1,2,3,4). Neoplasia may occur in patients with a history of hyperthyroidism, who have long been believed to be protected against cancer by suppression of thyroid-stimulating hormone (TSH) (5,9,10). However, our data do not support the concept of increased occult thyroid malignancy and tumour aggressiveness associated with Graves' disease over a long period of follow-up.

Only two patients had papillary thyroid microcarcinoma without evidence of recurrence or distant metastases. Tumours in patients with Graves' disease were no larger than in other patients and behaved no differently from those in non-Graves' patients. These results contrast with those of Belfiore et al. (7) who reported a high incidence of local invasiveness, lymph node involvement and distant metastases in their patients with Graves' disease and thyroid cancer. However, all but two of their Graves' patients had palpable nodules in contrast to the present study (none had nodules) which could indicate that tumours in the previous study were detected later and hence had a poorer outcome.

It has been previously reported that Graves' patients have an increased prevalence of benign thyroid nodules and also of differentiated thyroid carcinomas, mainly of the papillary type, suggesting that Graves' disease stimulates occult cancer progression to a clinical disease (11). As TSH stimulates growth of metastatic differentiated thyroid carcinoma expressing the TSH receptor (TSHR), it is possible to hypothesize that high levels of the anti-TSHR antibodies of Graves' patients might stimulate thyroid cancer growth. Anti-TSHR antibodies can be detected in more than 95% of subjects with Graves' disease with new assays (12). In our study, one cancer patient has moderate elevated anti-TSHR antibodies and the other cancer patient had strong elevated anti-TSHR antibodies, but this result should be interpreted with caution as we have two cases only in all of our patients with Graves' disease. No evidence of multifocality was found in the histological specimens, although a higher frequency may have been found if all patients had undergone total thyroidectomy. Nevertheless, the prognosis of our patients remained good and, as expected, neither local recurrence nor distant metastases were detected during the long period of follow-up. Care is needed in interpreting histology as the diffusely hyperplastic gland of Graves' disease may simulate malignancy; the cases in this series were all diagnosed by experienced pathologists according to established criteria (13).

CONCLUSION

Our results do not suggest an increased incidence and aggressiveness in thyroid carcinomas associated with Graves' disease. Further work is needed to define risk factors and the optimal treatment for this group of patients.

REFERENCES

1. Pacini F, Elisei R, Di Coscio GC, Anelli S, Macchia E, Concetti R, Miccoli P, Arganini M, Pinchera A. Thyroid carcinoma in thyrotoxic patients treated by surgery. *J Endocrinol Invest* 1988; 11: 107-112.
2. Linos DA, Karakitsos D, Papademetriou J. Should the primary treatment of hyperthyroidism be surgical? *Eur J Surg* 1997; 163: 651-657.
3. Gabriele R, Letizia C, Borghese M et al. Thyroid cancer in patients with hyperthyroidism. *Horm Res* 2003; 60: 79-83.
4. Terzioglu T, Tezelman S, Onaran Y, Tanakol R. Concurrent hyperthyroidism and thyroid carcinoma. *Br J Surg* 1993; 80: 1301-1302.
5. Vaiana R, Cappelli C, Perini P, Pinelli D et al: Hyperthyroidism and concurrent thyroid cancer. *Tumori* 1999; 85: 247-252.
6. Miccoli P, Minuto MN, Galleri D et al. Incidental thyroid carcinoma in a large series of consecutive patients operated on for benign thyroid disease. *ANZ J Surg* 2006; 76: 123-126.
7. Belfiore A, Garofalo MR, Giuffrida D et al. Increased aggressiveness of thyroid cancer in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 830-835.
8. Hales IB, McElduff A, Crummer P et al. Does Graves' disease or thyrotoxicosis affect the prognosis of thyroid cancer? *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 886-889.
9. Vaiana R, Cappelli C, Perini P et al. Hyperthyroidism and concurrent thyroid cancer. *Tumori* 1999; 85: 247-252.
10. Miccoli P, Minuto MN, Galleri D et al. Incidental thyroid carcinoma in a large series of consecutive patients operated on for benign thyroid disease. *ANZ J Surg* 2006; 76: 123-126.
11. Costante G, Grasso L, Schifino E et al. Iodine deficiency in Calabria: characterization of endemic goiter and analysis of different indicators of iodine status region-wide. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 201-207.
12. Belfiore A, Russo D, Vigneri R, Filetti S: Graves' disease, thyroid nodules and thyroid cancer. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 711-718.
13. Ando T, Latif R, Davies TF. Thyrotropin receptor antibodies: new insights into their actions and clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 33-52.
14. Rosai J, Carcangiu ML, Delellis RA. *Atlas of Tumour Pathology*. 3rd series. Fascicle 5, *Tumours of the Thyroid Gland*. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992, 302.

NOUTĂŢI

O METODĂ RAPIDĂ DE IZOLARE ŞI IDENTIFICARE A BACTERIILOR ÎN HEMOCULTURĂ

Studiul descrie o metodă rapidă de identificare preliminară în doar 5 ore a bacteriilor izolate în hemoculturi incubate în sistemul automat Bactec9240 (Becton Dickinson, Sparks, USA). Metoda este propusă de Ozenci et al. după studiul prospectiv efectuat pe 541 de hemoculturi la Karolinska University Hospital. Pentru 92% dintre acestea utlizând algoritmul imiginat au identificat speciile frecvent izolate din hemoculturi: *Staphylococcus aureus, E. coli, S. pneumoniae, Enterococcus spp.* Tehnica este accesibilă tuturor laboratoarelor (2-5 euro/probă) şi este propusă de către autori alternativă pentru tehnicile rapide de biologie moleculară (Özenci V, Tegmark-Wisell K, Lundberg C, Wretlind B. Rapid culture and identification: a practical method for early preliminary laboratory diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 174-189).

Carmen Pânzaru

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2007 - vol. 111, nr. 3

UTILIZAREA DRENAJULUI PERCUTAN ECOGHIDAT ÎN TRATAMENTUL COMPLICAŢIILOR SEPTICE LOCALE ALE PANCREATITEI CRONICE

S.T. Barbu[1], N. Rednic[2], M. Cazacu[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "I. Haţieganu" Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină
1 Clinica Chirurgicală IV
2 Clinica Medicală IV

ULTRASOUND GUIDED PERCUTANEOUS DRAINAGE OF CHRONIC PANCREATITIS LOCAL SEPTIC COMPLICATIONS (Abstract): **Aim**: To evaluate results of ultrasound guided percutaneous catheter drainage (PCD) for local septic complications of chronic pancreatitis. **Material and method**: Between 1999 and 2002, PCD was used in 19 patients with chronic pancreatitis for 6 infected acute pseudocysts, 3 post-necrotic abscesses, 3 abscesses following pancreatic resections, 6 abscesses with none of the precipitating factors present (no acute episode or recent surgical/endoscopic interventions) and a tuberculous peritoneal empiema. In 17 patients, collections were unilocular. **Results**: Trocar technique was used in 14 patients and Seldinger technique in 5. Sixteen patients were successfully treated with PCD alone (mean drainage duration = 32 days) without abscess recurrence during the follow-up period (mean = 35.6 month). Surgical treatment was necessary in 3 patients. Pseudocyst recurrence occurred in another patient after 9 months. **Conclusion**: PCD should be considered as the initial therapy for chronic pancreatitis local septic complications. Surgery is reserved for patients in whom PCD fails. **Key words**: ABSCESS, PANCREATIC DISEASES, PANCREATIC PSEUDOCYST, PROGNOSIS, ULTRASONOGRAPHY

Pancreatita cronică este o afecţiune inflamatorie evolutivă, caracterizată prin distrugerea ireversibilă a structurii pancreasului şi pierderea permanentă a funcţiei exo- şi endocrine (1,2). Complicaţiile septice locale ale pancreatitei cronice, prin sepsisul sever pe care îl produc, pericliteză viaţa acestor bolnavi malnutriţi, imunodeprimaţi, majoritatea alcoolici.

Colecţiile lichidiene pancreatice şi peripancreatice (CLP) sunt caracteristice pancreatitei acute, dar pot complica şi evoluţia pancreatitei cronice, reflectând caracterul dinamic al acestor afecţiuni (3). Prima clasificare general acceptată a CLP a fost emisă la Atlanta în 1992 (4). CLP infectate sau simptomatice trebuie drenate prin metode chirurgicale, percutanate sau endoscopice (3,5).

De la introducerea sa în practica medicală în urmă cu peste 20 de ani, drenajul percutan ghidat imagistic a înlocuit treptat intervenţia chirurgicală, devenind tratamentul iniţial al majorităţii abceselor intraabdominale, cu rezultate bune la 70-93% din cazuri, cu o mortalitate de 1-11% şi 1-15% complicaţii (6).

Scopul studiului de faţă este reprezentat de evaluarea indicaţiilor, a tehnicii şi rezultatelor drenajului percutan ecoghidat utilizat în tratamentul complicaţiilor septice locale ale bolnavilor cu pancreatită cronică.

MATERIAL ŞI METODĂ

Eşantionul de bolnavi

În perioada de 4 ani 1 ianuarie 1999 - 31 decembrie 2002, în Clinica Chirurgicală IV Cluj-Napoca s-a utilizat drenajul percutan ecoghidat la 19 bolnavi cu complicaţii septice locale ale pancreatitei cronice. Diagnosticul de pancreatită cronică a fost pus atunci când erau prezente unul sau multe dintre criteriile: leziuni moderate şi severe ale ductelor pancreatice conform "criteriilor de la Cambridge" (7); calcificări pancreatice (evidenţiate pe radiografii abdominale simple sau la computer tomografie); rezultat anatomopatologic obţinut din piesa de biopsie şi/sau rezecţie chirurgicală.

Toţi bolnavii au fost internaţi în clinică cu indicaţia de intervenţie chirurgicală, fiind trimişi de medici din diferite specialităţi. Motivul internării a fost starea septică, care fusese tratată conservator un interval variabil de timp.

Decizia de efectuare a drenajului percutan ecoghidat s-a luat după discutarea opţiunilor terapeutice şi obţinerea consimţământului scris de la fiecare pacient. Procedura a fost efectuată de echipa chirurg - ecografist (gastroenterolog). În funcţie de starea bolnavilor, aceştia au fost urmăriţi în secţia de chirurgie sau terapie intensivă. Pacienţii au fost urmăriţi prospectiv (la 3 luni în primul an, şi apoi de două ori pe an) până la data încheierii studiului, 30 septembrie 2007.

Definiţii

Complicaţiile septice locale ale pancreatitei cronice au fost clasificate conform definiţiilor din literatură (4,8,9). Pseudochistele infectate au avut toate culturi pozitive şi majoritatea conţineau puroi cremos, sedimentat în partea declivă. *Episodul de pancreatită acută apărut în evoluţia pancreatitei cronice* (10,11) a fost diagnosticat pe baza prezenţei durerii acute, tipice (în bară) şi a creşterii enzimelor pancreatice de cel puţin 5 ori limita superioară a valorilor normale şi/sau pe baza rezultatelor imagistice - scor Balthazar > C (12).

Rezultatele drenajului percutan ecoghidat au fost evaluate conform definiţiilor Comitetului de practică al Societăţii de Radiologie Intervenţională (13) (tab. I).

Examinarea imagistică

Ecografia şi tomografia computerizată au fost efectuate la toţi bolnavii. În funcţie de numărul, dimensiunea şi localizarea colecţiilor, s-a ales calea de acces şi drenaj percutan cea mai sigură. Imagistica a determinat şi gradul modificărilor structurale acute şi cronice ale pancreasului.

Drenajul percutan

A fost realizat sub ghidaj ecografic, în anestezie locală, după administrarea unui sedativ hipnotic (Midazolam). S-a practicat o mică incizie a pielii pentru introducerea uşoară a acului de puncţie. Diametrul tubului de dren utilizat a fost ales în funcţie de dimensiunea colecţiei şi natura conţinutului acesteia (grad de vâscozitate, prezenţa sau absenţa particulelor solide).

Tehnica trocarului

A fost utilizată atunci când a fost accesibilă o cale directă. Sub ghidaj ecografic, tubul de dren cu trocarul în interiorul său s-a introdus prin mica incizie din piele până în colecţie. S-a extras trocarul şi s-a aspirat pentru confirmarea poziţionării. Tehnica trocarului ne-a permis să introducem unul sau mai multe tuburi de dren cu diametrul mare (12-28F), pe care lavajului şi drenajului colecţiilor a fost eficient, cu puţine complicaţii.

TABELUL I

Definiţiile rezultatelor drenajului percutan ghidat imagistic (13)

Succes	Rezolvarea colecţiei, care nu mai necesită o intervenţie chirurgicală.
Succes parţial	Un drenaj de temporizare, folosit pentru stabilizarea sepsisului pacientului înaintea intervenţiei chirurgicale.
Eşec	Necesitatea convertirii drenajului percutan în drenaj chirurgical, înainte dc rezolvarea stării septice sau a colecţiei.

Tehnica Seldinger

A fost folosită atunci când colecţia a fost situată profund, iar calea de drenaj a traversat ficatul, sau trecea în aproapierea altor organe sau vaselor mari (calea transgastrică a fost utilizată numai pentru puncţie - confirmarea puroiului sau obţinerea de lichid pentru cultură). Sub ghidaj ecografic, s-a introdus un ac (21G) în colecţie şi prin el un fir ghid metalic (26G). După scoaterea acului, pe firul ghid au fost introduse dilatatoare de dimensiuni tot mai mari, până la dimensiunea tubului de dren utilizat (6F - 10F). După introducerea drenului, ghidul metalic a fost extras.

Menţinerea drenului

Tubul de dren a fost fixat la piele şi conectat la o pungă în care să dreneze prin gravitaţie. Cantitatea drenată a fost înregistrată zilnic. Pe tuburile de dren s-a efectuat lavajul cavităţii colecţiei cu ser fiziologic la temperatura corpului, de 2 ori pe zi în prima săptămână şi apoi o dată pe zi, în funcţie de conţinutul exteriorizat. Tuburile au fost suprimate atunci când cantitatea drenată a fost < 10 ml/24 ore, 2 zile consecutiv, iar ecografic nu s-a evidenţiat cavitate restantă sau colecţii nedrenate.

Analiza statistică

S-a analizat posibila asociaţie a 6 variabile independente: tipul colecţiei (pseudochist infectat sau abces), tehnica drenajului (Seldinger sau tehnica trocarului), diametrul şi complexitatea colecţiei (uni- sau multiloculară), vârsta şi sexul bolnavilor), cu succesul sau eşecul drenajului percutan, prin analiză uni- şi multivariată. Valoarea lui *p* mai mică de 0,05 a fost considerată semnificativă statistic. Analiza a fost efectuată cu programul Statistica™ (data analysis software system) versiunea 6.0 (StatSoft, Inc. 2001).

REZULTATE

Etiologia pancreatitei cronice a fost etanolică la 16 bolnavi (84,2%), hiper-trigliceridemică la 2 (10,5%) şi idiopatică la 1 (0,3%). Colecţiile septice drenate au fost: 6 pseudochisturi infectate şi 13 abcese: 3 abcese pancreatice postnecrotice, 3 abcese după rezecţii pancreatice, 6 abcese "silenţioase" (fără prezenţa unui factor etiologic evident: episod acut, intervenţie chirurgicală sau endoscopică recentă) şi un empiem peritoneal tuberculos. Perioada de urmărire medie a fost de 35,6 luni (limite 23 şi 75 luni).

Pseudochisturile pancreatice acute infectate - tipul II după clasificarea lui d'Egidio şi Schein (9) au fost 5 uniloculare, iar un bolnav a prezentat un pseudochist dublu (fig. 1). Infecţia cu stare septică severă a impus drenajul percutan, cu scopul de a rezolva pseudochistului şi de a evita drenajul extern chirurgical. Tehnica Seldinger a fost utilizată la 3 bolnavi, dintre care la 2 calea de drenaj a traversat lobul stâng (fig. 2). Rezultatele sunt prezentate în tab. III.

Abcese pancreatice şi peripancreatice au fost diagnosticate la 13 bolnavi.

a) 3 bolnavi - *abcese după un episod*

TABELUL II

Caracteristicile bolnavilor şi ale tipului de colecţie drenat

	Pseudochist acut (tip II) (nr = 6)	**Abces pancreatic (nr = 13)**	**Total (nr = 19)**
Vârsta (ani) medie (limite)	**45,8** (35-52)	**51,2** (38-59)	**48,5** (35-59)
Sex masculin nr. (%)	**5** (83,3%)	**11** (84,6%)	**16** (84,2%)
Diametrul (cm) medie (limite)	**10,5** (7-15)	**14** (7-45)	**12,25** (7-45)
Unilocular	**5** (83,3%)	**12** (92,3%)	**17** (89,4%)

Fig. 1. Pseudochist dublu, infectat, ce comprimă calea biliară principală (CB) şi vena portă (VP)

Fig. 2. Tubul de dren introdus percutan traversează lobul stâng hepatic

TABELUL III

Rezultatele drenajului percutan al pseudochistelor tip II

Succes	3 bolnavi **(50%)**
Succes parţial	2 bolnavi **(33,3%)** – au necesitat tratament chirurgical după 2 şi 3 zile, datorită drenajului ineficient, dar starea septică a fost stabilizată
Eşec	1 bolnav **(16,7%)** – recidivă după 9 luni (eşec la distanţă, succes imediat)

Fig. 3. Introducerea unui dren 28F prin tehnica trocarului în cavitatea abcesului

Fig. 4. Abces multilocular după episod acut de pancreatită

acut de pancreatită (bine documentat) dezvoltat pe fondul pancreatitei cronice (abcesul s-a format la 3-5 săptămâni de la debutul episodului acut). Tehnica trocarului a fost utilizată la 2 bolnavi (fig. 3) iar tehnica Seldinger la unul. Un abces a fost multilocular (fig. 4) şi a necesitat drenaj chirurgical după 7 zile (eşec). Abcesele uniloculare au fost rezolvate prin drenajul percutan (succes = 66,6%).

b) 3 bolnavi – *abcese după o rezecţie pancreatică* efectuată pentru complicaţii ale pancreatitei cronice. Abcesele au devenit evidente la 14-21 de zile postoperator, au fost toate uniloculare şi cu fost drenate cu succes percutan (tehnica Seldinger 1, tehnica trocarului 2), necesitând o perioadă relativ scurtă de menţinere a drenului (medie=16,4 zile).

c) 6 bolnavi – *abcese "silenţioase"* ("spontane"), definite ca abcese ce apar în evoluţia pancreatitei cronice fără prezenţa unui factor etiologic: episod acut evident, intervenţie chirurgicală sau ERCP recente (14,15). Toate au fost uniloculare, cu diametrul mediu de 15,2 cm, situate în bursa omentală şi au fost drenate cu succes prin metoda trocarului.

d) un caz de *empiem peritoneal tuberculos* (asociat cu pleurezie bilaterală) la un bolnav cu pancreatită cronică severă şi antecedente de tuberculoză. Empiemul a apărut la 6 luni după montarea endoscopică a unui stent în ductul Wirsung pentru ascită pancreatică (care s-a vindecat). Prin tehnica trocarului s-a montat un dren suprapubian menţinut 46 zile şi apoi un dren subfrenic stâng pentru un abces restant al lojei splenice (13 zile), cu rezolvarea empiemului, care nu a recidivat în cursul perioadei de urmărire.

Durata medie de menţinere a drenului montat percutan la cei 19 bolnavi a fost de 32 zile, cu o durată medie de spitalizare de 12,9 zile.

Analiza statistică a arătat că: abcesele (pancreatice şi peripancreatice), unilocularitatea colecţiei şi tehnica trocarului sunt factori independenţi de prognostic pentru succesul drenajului percutan.

DISCUŢII

Colecţiile septice intra-abdominale au fost tratate dintotdeauna cu succes prin drenaj chirurgical, dar cu o mortalitate de 15-43% (5,13,16,17). Drenajul percutan ghidat imagistic a înlocuit treptat drenajul chirurgical în cazurile bine selectate, reducând mortalitatea, morbiditatea şi cheltuielile de spitalizare (13).

Conform definiţiilor din tab I (13), în studiul nostru am obţinut un procent de succese imediate de 84,2% (nr=16) şi la distanţă de 78,9% (dacă luăm în considerare bolnavul cu recidiva de pseudochist), comparabile cu procentele de 70-90% raportate în literatură (3,5,8,13). Procentul mare de succese se datorează selecţiei stricte a bolnavilor: colecţii mari, majoritatea uniloculare şi utilizării de tuburi groase de dren introduse prin tehnica trocarului la 73,7% din bolnavi (nr=14), aşa cum ne arată şi rezultatele analizei statistice. Unilocularitatea colecţiei nu reprezintă însă o indicaţie restrictivă. Stăpânirea unei tehnici bune, cu montarea şi repoziţionarea de mai multe drenuri, poate duce la rezultate similare şi în colecţiile multiloculare.

Pseudochistele acute infectate tip II d'Egidio au fost drenate percutan cu rezultate bune (succes + succes parţial = 83,3%), comparabile cu datele recente din literatură (18). Cu toate că rezultatele sunt satisfăcătroare (deşi semnificativ inferioare celor obţinute la abcese). recidiva la 9 luni a unui pseudochist ne confirmă faptul că pentru pseudochistele tip II şi III din clasificarea d'Egidio (9) chirurgia rămâne "standardul de aur" al tratamentului. Drenajul percutan are rolul de a stabiliza starea septică, permiţând efectuarea tratamentului chirurgical (drenajul intern) în condiţii optime pentru bolnav.

Selectarea riguroasă a celor 13 bolnavi cu abcese pancreatice şi peripancreatice a dus la rezultate foarte bune (92,3% succes), similare cu datele din literatură (5,16,17). Abcesele peripancreatice postoperatorii au fost rezolvate 100% prin drenaj percutan, cu durata cea mai scurtă de menţinere a tuburilor de dren şi cea mai scurtă spitalizare, rezultate raportate şi de alţi autori (19), subliniind rolul important postoperator al drenajului percutan, care a evitat reintervenţia.

Termenul "colecţii lichidiene pancreatice" cuprinde un grup heterogen de procese patologice. Mecanismul lor de formare şi conţinutul lor depinde de prezenţa şi severitatea unui episod acut de pancreatită, de gradul modificărilor ductale pancreatice (acute sau cronice) existente şi de gradul lor de maturare - timpul scurs de la debutul episodului acut (20). Complicaţiile septice locale ale pancreatitelor cuprind: necrozele infectate, necrozele sterile şi abcesele pancreatice (8). Pseudochistele pancreatice acute infectate sunt grupate în literatură împreună cu abcesele (3,5,20,21,22,23,24), deşi mecanismul de formare este diferit, da-

torită faptului că necesită acelaşi tratament de urgenţă: drenajul.

Aşa cum reiese din definiţii şi din cazurile prezentate, complicaţiile septice locale ale pancreatitei cronice sunt datorate suprapunerii unui episod acut sever de pancreatită acută. Abcesele dezvoltate după rezecţii pancreatice au fost încadrate şi ele aici, deoarece nu s-au datorat unui drenaj insuficient, ci unei pancreatite acute postoperatorii, documentată prin creşterea amilazelor serice şi urinare (>5 ori valorile normale) în primele zile după operaţie şi exteriorizarea pe tubul de dren montat percutan (la unul din bolnavi) de sfaceluri epiploice cu pete de citosteatonecroză (ce nu existau în momentul intervenţiei chirurgicale). Abcesele silenţioase, sunt abcese tipice pancreatitei cronice dezvoltate conform definiţiei fără un episod acut evident, printr-un mecanism neelucidat încă şi care pot să apară şi la nivelul ficatului şi splinei (14,15).

CONCLUZII

Complicaţiile septice locale ale pancreatitei cronice sunt produse de episoade de pancreatită acută severă suprapuse evoluţiei bolii, cu excepţia abceselor silenţioase la care lipsa episodului acut este definitorie.

Drenajul percutan ghidat ecografic joacă un rol important în tratamentul acestor complicaţii, având rezultate foarte bune în drenajul abceselor pancreatice şi peripancreatice.

Pseudochisturile acute tip II infectate vor fi drenate percutan numai pentru stabilizarea sepisului înaintea drenajului intern chirurgical, sau atunci când bolnavul refuză intervenţia chirurgicală.

Succesul drenajului percutan depinde de selecţionarea riguroasă a bolnavilor (colecţii mari, uniloculare, cale de acces sigură), stăpânirea unei tehnici corespunzătoare şi utilizarea de drenuri cu dimensiuni adecvate conţinutului colecţiei.

În final, putem afirma că drenajul percutan ecoghidat trebuie să fie utilizat ca tratament iniţial al complicaţiilor septice locale ale pancreatitei cronice, tratamentul chirurgical fiind rezervat bolnavilor la care drenajul percutan eşuează.

BIBLIOGRAFIE

1. Ahmad SA, Wray CJ, Rilo HR et al. Chronic pancreatitis: recent advances and ongoing challenges. *Curr Probl Surg* 2006; 43: 135-238.
2. Ammann RW, Mullhaupt B. Do the diagnostic criteria differ between alcoholic and nonalcoholic chronic pancreatitis? *J Gastroenterol* 2007; 42 (Suppl XVII): 118-126.
3. Neff R. Pancreatic pseudocysts and fluid collections: percutaneous approaches. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 399-403.
4. Bradley EL III. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993; 128: 586-590.
5. Baril NB, Ralls PW, Wren SM, et al. Does an infected peripancreatic fluid collection or abscess mandate operation? *Ann Surg* 2000; 231(3): 361-367.
6. Duszak RL Jr, Levy JM, Akins EW, et al. Percutaneous catheter drainage of infected intra-abdominal fluid collections. American College of Radiology. ACR Appropriateness Criteria. *Radiology* 2000; 215 Suppl: 1067-1075.
7. Axon ATR, Classen M, Cotton PB, Cremer M, Freeny PC, Lees WR. Pancreatography in chronic pancreatitis: international definitions. *Gut* 1984, 25: 1107-1112.
8. Howard TJ, Wiebke EA, Mogavero G, et al. Classification and treatment of local septic complications in acute pancreatitis. *Am J Surg* 1995; 170(1): 44-50.

9. D'Egidio A, Schein M. Pancreatic pseudocysts: a proposed classification and its management implications. *Br J Surg* 1991; 78: 981-984.
10. Levy P. Natural history of alcoholic chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin Biol* 2002; 26: B114-B123.
11. Levy P, Barthet M, Mollard BR, Amouretti M, Marion-Audibert AM, Dyard F. Estimation of the prevalence and incidence of chronic pancreatitis and its complications. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30: 838-844.
12. Balthazar EJ, Ranson JH, Naidich DP, Megibow AJ, Caccavale R, Cooper MM. Acute pancreatitis: prognostic value of CT. *Radiology* 1985; 156: 767-772.
13. Bakal CW, Sacks D, Burke DR, et al, for the Society of Interventional Radiology Standards of Practice Committee. Quality Improvement Guidelines for Adult Percutaneous Abscess and Fluid Drainage. *J Vasc Interv Radiol* 2003; 14: S223-S225.
14. Ammann R, Munch R, Largiader F, Akovbiantz A, Marincek B. Pancreatic and hepatic abscesses: a late complication in 10 patients with chronic pancreatitis. *Gastroenterol* 1992; 103: 560-565.
15. Lankisch PG, Buller T, Elgrechtz F. The silent killer: fatal abscess as a late complication in chronic calcifying pancreatitis, painless for 11 years. *Pancreas* 2002; 24(3): 315-316.
16. Srikanth G, Sikora SS, Baijal SS, et al. Pancreatic abscess: 10 years experience. *ANZ J Surg* 2002; 72: 881-886.
17. Mithofer K, Mueller PR , Warshaw AL. Interventional and surgical treatment of pancreatic abscess. *World J Surg* 1997; 21: 162-168.
18. Zhang AB, Zheng SS. Treatment of pancreatic pseudocysts in line with D'Egidio's classification. *World J Gastroenterol* 2005; 11(5): 729-732.
19. Cinat ME, Wilson SE, Din AM. Determinants for successful percutaneous image-guided drainage of intra-abdominal abscess. *Arch Surg* 2002; 137; 845-849.
20. Baron TH, Morgan DE. The diagnosis and management of fluid collections associated with pancreatitis. *Am J Med* 1997; 102: 555-563.
21. Navalho M, Pires F, Duarte A, Goncalves A, Alexandrino P, Tavora I. Percutaneous drainage of infected pancreatic fluid collections in critically ill patients: correlaion with C-reactive protein values. *J Clin Imag* 2006; 30: 114-119.
22. Barbu ST, Rednic N. Percutaneous drainage of pancreatic fluid collections. In "*HWSR 2005: Intra-abdominal sepsis – unresolved issues*" Proceedings of The First International Humboldt Workshop on Surgical Research, Bucharest, May 5-7, 2005; 177-191.
23. Kruger M, Schneider AS, Manns MP , Meier PN. Endoscopic management of pancreatic pseudocysts or abscesses after an EUS-guided 1-step procedure for initial access. *Gastrointest Endosc* 2006; 63: 409-416.

NOUTĂŢI

DESCOPERIRE GENETICĂ MAJORĂ ÎN SCLEROZA MULTIPLĂ

La începutul anilor 1970 s-a descoperit asocierea HLA-DRB1 cu scleroza multiplă (SM). În iulie 2007 în *Nature Genetics* şi *New England Journal of Medicine* Jonathan Haines, profesor la Vanderbilt University, Tennessee, publică descoperirea genei receptorului *IL7R*. Prin metoda convergenţei genomice au fost analizate 7000 probe de ADN de la pacienţi cu SM şi familiile lor (din SUA) şi comparate cu probe provenite de la subiecţi sănătoşi. Au fost identificate 28 de gene candidate dintre care *IL7R* a fost semnificativ asociată cu SM. S-au analizat 931 de familii din Anglia şi Belgia descoperind în afara genei *IL7R* o nouă genă candidată pentru riscul SM, *IL2R* (Haines J et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357: 851-862).

G. Pânzaru

VARIAŢIA VALORILOR PSA LA PERSOANELE CU CANCER DE PROSTATĂ ÎN STADIU LATENT

K. Stamatiou[1], M. Danciu[2], C. Karakos[1], F. Sofras[3]
1 General Hospital of Thebes
University of Medicine and Pharmacy "Gr.T. Popa" Iaşi
School of Medicine
2 Pathology Department
3 University Hospital of Heraclion

PSA VARIATIONS IN PERSONS WITH LATENT PROSTATE CANCER (Abstract): The introduction and common use of serum PSA (Prostate Specific Antigen) has been demonstrated a useful index on latent prostate cancer diagnostic but in the same time has increased surgical intervention on histological forms with no eventual future evolution. Benign comportment of latent carcinomas being well known in advance, we correlated in vitro serum PSA from latent tumors, with the samples from a control group (prostates without signs of malignization). Levels of PSA were slightly elevated compared to age norms, mainly in cases with a large coexistent hypertrophy. Our reduced sample does not stand any statistic analysis, but this observation could eventually explain increased diagnostic and hyper-treatment of non-important carcinomas from a clinical point of view. **Key words**: PSA, PROSTATE BIOPSY, LATENT CANCER, TUMORS CLINICALLY INSIGNIFICANT

Acest studiu şi-a propus investigarea post mortem a existenţei diferenţelor între nivelul PSA-ul provenit de la cadavrele pacienţilor cu carcinom latent de prostată faţă de nivelul PSA-ului de la cadavrele pacienţilor fără semne de malignizare la necropsie. De asemenea, am urmărit stabilirea de corelaţii între carcinoamele latente şi neoplaziile active din punct de vedere clinic.

Carcinomul latent a fost definit ca fiind orice carcinom diagnosticat în cursul necropsiei, fără să fi fost diagnosticat la pacient în timpul vieţii, nu a constituit cauza morţii, nu a fost palpabil la examenul digital practicat în timpul diagnosticului clinic şi nici nu avea tendinţa de expansiune locală sau la distanţă. Drept nesemnificativ a fost definit carcinomul de stadiul T1a, de volum mai redus de 0,5 cm^3, grad Gleason egal sau mai mic de 3 (scor Gleason mai mic de 7) şi fără tendinţă de infiltrare (1).

MATERIAL ŞI METODĂ

Lotul de studiu: A fost constituit din 61 de pacienţi de origine greacă, cu domiciliu permanent în Grecia, de vârstă între 60-75 ani, care au decedat în perioada iunie 2004 - iunie 2005. Dintre aceştia, 14 au fost diagnosticaţi cu carcinom latent de prostată. Cauzele deceselor au fost variate, dar au fost excluse cazurile cu carcinom de prostată şi afecţiuni legate de acesta. Nu au fost luaţi în consideraţie următorii parametri: profesia, nivelul socio-economic, locul naşterii şi cauza morţii. Necropsia a fost efectuată la cel puţin 24 de ore de la momentul constatării semnelor de instalare a morţii, cadavrul fiind păstrat în frigider până la necropsie. Au fost excluse din lotul de studiu cazurile cu istoric de cancer de prostată, examen digital patologic înainte de necropsie şi cadavrele la care au fost diagnosticate macroscopic metastaze, indiferent de ţesutul sau organul interesat.

Prelevarea şi prelucrarea materialului tisular pentru examenul histopatologic: De la fiecare pacient au fost prelevate întreaga prostată şi veziculele seminale. Preparatele au fost înregistrate, cântărite şi măsurate în toate cele 3 axe (lungime, înălţime şi lăţime). Suprafaţa celor 2 lobi a fost colorată distinct (roşu pentru lobul drept şi albastru pentru cel stâng) şi stabilizarea culorii fiind făcută cu acid acetic. Fixarea s-a făcut cu formol 10% tamponat, pH neutru prin injectarea acestuia în vasele existente în prostata biopsiată, după care aceasta a fost imersată în formol, timp de 72 de ore. După separarea prin secţiuni transversale de veziculele seminale, bază şi vârf, restul glandei a fost divizată în două părţi (dreaptă şi stângă). Toate fragmentele au fost secţionate la o grosime de 4 mm, după care au fost deshidatate prin treceri succesive în băi de alcool etilic 70%, 80%, 96% şi 100%, spalate în xylol şi incluse în parafină. Din blocurile de parafină au fost realizate secţiuni de 4-6 microni, ce au fost colorate cu Hematoxilină-eozină şi van Gieson.

Proba de sânge pentru măsurarea PSA a fost extrasă dintr-o cavitate ventriculară. Evaluarea semicantitativă a PSA s-a făcut utilizând Hybriteck Tandem-R assay.

Evaluarea histologică: Diagnosticul carcinomului de prostată a fost stabilit pe baza criteriilor din sistemul de clasificare WHO (2). Cazurile de cancer au fost clasificate histopatologic în mod independent de către 2 anatomopatologi conform sistemului Gleason. Pentru fiecare caz pozitiv au fost identificate gradele Gleason care au predominat cantitativ în masa tumorală. Suma acestor grade a constituit scorul Gleason. Pentru tumorile multifocale, cel mai mare nodul a fost considerat drept tumoră de bază, iar scorul Gleason respectiv a fost utilizat pentru clasificarea neoplaziei în totalitate.

REZULTATE

Au fost identificate 14 cazuri de carcinom latent de prostată. În majoritatea cazurilor, valorile sangvine ale PSA-ului au fost sub valori normale corespunzătoare vârstei (6 ng/ml). În toate cazurile cu cancer de prostată, valorile PSA s-au corelat cu gradul de diferenţiere histologică, diferenţa nedepăşind valoarea limită de 4 ng/ml (tab. I).

În cazurile de carcinom latent fără un fond de hipertrofie benignă de grad mare, valorile PSA-ului s-au încadrat în limite fiziologice corespunzătoare vârstei. Pe de altă parte, în cazul coexistenţei malignizării *in situ* cu hipertrofia nodulară benignă, au fost observate valori mai înalte ale PSA-ului.

Volumul a 13 din cele 14 carcinoame latente reprezenta mai puţin de 5% de volumul total al prostatei, încadrându-se în stadiul T1a conform sistemului de stadializare TNM, dacă ar fi diagnosticate în cursul vieţii (tab. II). Dintre ele, unul (7,7%) a fost slab diferenţiat, iar restul (5 cazuri, 38,5%) erau moderat sau bine diferenţiat (7 cazuri, 53,8%). În 7 cazuri (53,8%) tumora a fost solitară, cu un volum mai mic

TABELUL I
Valorile PSA raportate la gradul de diferenţiere tumorală

	Carcinom de prostată		
	Bine diferenţiat	Moderat diferenţiat	Slab diferenţiat
Nr. pacienţi	9	4	1
PSA (ng/ml)	2-7	6-8	6

TABELUL II

Corelaţia dintre volumul prostatei şi valoarea PSA

	Volumul prostatei	
	≤ 50 cm^3	> 50 cm^3
Cazuri cu cancer de prostată	4	6
Nr. total de cazuri	43	18
PSA (ng/ml)	**≤ 4**	**≤ 8**

TABELUL III

Variabilitatea PSA-ului în tumorile uni- şi multifocale

	Tumori nemnificative clinic	
	Unifocale	Multifocale
Nr. cazuri	7	6
Variaţii ale PSA (ng/ml)	2-4	2-8

sau egal de 0,5 cm^3, iar în 5 cazuri (38,5%) tumorile au fost multifocale, cu un volum total sub 1 cm^3. Volumul mediu al fiecăruia dintre nodulii tumorali ocupa mai puţin de 0,5 cm^3. O tumoră multifocală din lotul nostru de studiu a fost costituită din 2 sau 3 noduli. În carcinoame multifocale variaţiile PSA-ului au fost mai mari (tab. III).

DISCUŢII ŞI CONCLUZII

PSA est produs de celulele epiteliale din prostată. Valorile normale în serul sanguin variază în funcţie de vârstă şi de volumul glandei între 0 şi 4 ng/ml (3). Creşterea valorii PSA se poate produce ca rezultat al alterării structurii normale. Asemenea cazuri sunt hipertrofia benignă nodulară, carcinomul de prostată, în inflamaţii sau în alte modificări histologice. Valoarea PSA este corelată cu volumul tumorii prostatice. Un gram de ţesut malignizat creşte PSA-ul sangvin în medie cu 3,5 ng/ml, în timp ce hiperplazia benignă este responsabilă de o creştere mult mai redusă a PSA-ului (în medie cu 0,3 ng/ml) (4,5). Prezenţa carcinomului *in situ* poate fi mascată de coexistenţa unei hipertrofii importante, având în vedere că hipertrofia este cea care iniţiază creşterea PSA-ului (6). Astfel se explică valoarea prognostică redusă a PSA-ului la valori de 4-10 ng/ml în sânge (25-35%). La concentraţii ce depăşesc 10 ng/ml, creşte valoarea diagnostică pentru tumorile maligne (60-80%) (7). În contrast, în cazul carcinoamelor nesemnificative din punct de vedere clinic (cu volum <0,5 cm^3), la care creşterea PSA nu este mai mare de 1,75 ng/ml, coexistenţa hipertrofiei de orice grad creşte şansele de diagnostic precoce prin control pre-simptomatic. Studiul tumorilor *in situ* T_0, care au fost identificate prin biopsie, dar n-au fost confirmate apoi şi pe piesa de prostatectomie radicală (adevăratele carcinoame latente), arată că, la 57% din cazuri, valorile PSA-ului înainte de intervenţia chirurgicală au fost sub 6 ng/ml, iar la 85,71% din cazuri au fost sub 10 ng/ml (8). Chiar dacă este bine cunoscut că nivelul PSA din ser creşte odată cu stadiul carcinomului, această metodă are valoare limitată în recunoaşterea tumorii maligne latente cu comportament clinic nesemnificativ. Acest fapt se explică prin producerea de PCR atât de către tumoră cât şi de ţesutul prostatic benign (9). Deci, chiar dacă evaluarea nivelului PSA-ul seric a crescut semnificativ posibilitatea detectării formelor latente de tumori prostatice (10,11), a condus şi la tratamentul excesiv al tumorilor clinic nesemnificative (12,13).

Valorile PSA-ului sunt corelate cu volumul prostatei - PSAD (PSA Density - cantitatea de PSA raportată la volumul ţesutului prostatic). În cazul unei hipertrofii importante care coexistă cu o tumoră nepalpabilă, PSA-ul nu poate ajuta în diagnosticul diferenţial. Sugestionăm utilizarea complementară a PSAD pentru diferenţierea cancerului de prostată faţă de hiperplazia benignă de prostată (14,15).

BIBLIOGRAFIE

1. Anast JW, Andriole GL, Bismar TA, Yan Y, Humphrey PA. Relating biopsy and clinical variables to radical prostatectomy findings : can insignificant and advanced prostate cancer be predicted in a screening population? *Urol* 2004 ; 64 (3) : 544-550.
2. Sesterhenn IA. *Genitourinary Pathology.* Washington : AFIP, 2003.
3. Gann PH, Hennekens CH, Stamfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate specific antigen for detection of prostate cancer. *JAMA* 1995 ; 273 : 289-294.
4. Schmid HP, McNeal JE, Stamey TA. Observations on the doubling time of prostate cancer. The use of serial prostate-specific antigen in patients with untreated disease as a measure of increasing cancer volume. *Cancer* 1993 ; 71 (6) : 2031-2040.
5. Mochtar C, Ejiemeney L, van Riemsdijk E et al. Prostate-specific antigen as an estimator d'f prostate volume in the management d'f patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 2003 ; 44 : 695-700.
6. Ec Intyre I. Review of prostate cancer. *AUA 95th Annual Meeting Review.* Atalanta Georgia, 2000.
7. Haas GP, Montie JE, Pontes JE. The state of prostate cancer screening in the United States. *Eur Urol* 1993 ; 23 : 337-347.
8. Herkommer L. Pathological T0 prostate cancer withoyt neoadjuvant therapy : clinical presentation and follow up. *Eur Urol* 2004 ; 46 : 540-547.
9. Hudson MA, Bahnson RR, Catalona WJ. Clinical use of prostate-specific antigen in patients with prostate cancer. *J Urol* 1989 ; 142 : 1011-1017.
10. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW. Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen- based screening. *JAMA* 1993 ; 270 : 948-954.
11. Lu-Yao GL, Greenberg ER. Changes in prostate cancer incidence and treatment in USA. *Lancet* 1994 ; 343 : 251-254.
12. Etzioni R, Penson D, Legler J et al. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening : lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Nat Cancer Inst* 2002 ; 94 (13) : 981-990.
13. Jacobsen SJ, Katusic SK, Bergstralh EJ et al. Incidence of prostate cancer diagnosis in the eras before and after serum prostate-specific antigen testing. *JAMA* 1995 ; 274 : 1445-1449.
14. Benson MC, Whang IS, Pantuck A et al. Prostate specific antigen density : a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol* 1992 ; 147 : 815-816.
15. Irwin MB., Trapasso JG. Identification of insignificant prostate cancers : Analysis of the preoperation parameters. *Urol* 1994 ; 44 : 862.

7 ANI DE IMPLANT COCHLEAR ÎN CLINICA ORL A SPITALULUI CLINIC DE RECUPERARE IAŞI

D. Mârţu, Luminiţa Rădulescu, S. Cozma, A. I. Curcă
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină Dentară
Disciplina de ORL

SEVEN YEARS OF COCHLEAR IMPLANT IN ENT CLINIC OF "RECUPERARE" HOSPITAL IAŞI (Abstract): This paper presents our Cochlear Implant Departments results from the beginning untill present time. Our implant list contains 161 candidates. The enlisted was made based on the criteria's for implant candidates' selection and we have implanted already 17 of them (11 children and 6 adults). Surgical interventions were done according to standard procedure - the approach being through mastoidectomy and posterior timpanotomy. We discuss the results obtained with cochlear implantation in each case. The outline idea is that the cochlear implant was a good choice in all our implanted cases and the patients had achieved at least the performances predicted before implantation for every particular situation. **Key words**: COCHLEAR IMPLANT, POSTERIOR TIMPANOTOMY, CANDIDATES

Comunicarea a fost determinantă pentru fiinţa umană în devenirea sa ca *homo sapiens* (1,2,3).

Prin intermediul comunicării se realizează transmiterea informaţiei. Elementele procesului de comunicare sunt constituite din *minim* doi parteneri (emitaţor şi receptor) şi canalul de transmitere al mesajului. Limbajul prin care se vehiculează informaţiile poate fi verbal (1,2,3), nonverbal (4) şi paraverbal. Limbajul verbal reprezintă limbajul realizat cu ajutorul cuvintelor şi este considerat a fi cel mai important tip de limbaj în relaţionarea individului cu societatea. Considerată firească pentru cei mai mulţi dintre noi, comunicarea verbală şi paraverbală este imposibilă pentru persoanele cu handicap auditiv. Funcţia auditivă prezentă de la naştere permite dezvoltarea limbajului verbal, iar ulterior dezvoltarea intelectuală şi psihică precum şi integrarea socială a individului (5).

Până nu demult surditatea era o afecţiune netratabilă. Prevalenţa mare a hipoacuziei (10-12%) şi mai ales consecinţele deprivării auditive au impus rezervarea de importante resurse financiare pentru aprofundarea cercetărilor în vederea găsirii de soluţii. În ultimele decenii s-au făcut progrese remarcabile în dezvoltarea chirurgiei otologice, au apărut proteze auditive tot mai performante care au culminat cu implantul cohlear. În acest context s-a impus şi în ţara noastră introducerea implantului cohlear ca metodă de tratament a surdităţii profunde (6).

Astfel a fost posibil ca în 10.03.2000 să realizăm la Clinica ORL din Spitalul de Recuperare primul implant cohlear din România. Tot în anul 2000, în toamnă, după repetate intervenţii a venit prima recunoaştere din partea autorităţilor, prin înfiinţarea în clinica noastră a Compartimentului de Implant Cohlear.

Din anul 2002 clinica noastră a intrat în Programul Naţional de Implant Cohlear - ceea ce a însemnat un pas înainte.

Ne propunem să prezentăm rezultatele

activităţii compartimentului nostru de Implant Cohlear de la înfiinţare şi până în prezent.

MATERIAL ŞI METODĂ

Într-un interval de 7 ani în clinica noastră au fost evaluaţi pentru suspiciunea de hipoacuzie peste 1500 de pacienţi, hipoacuzia fiind confirmată în peste 1000 de cazuri.

Pe baza criteriilor care stau la baza indicaţiei de implantare cochleară (surditate) până în prezent pe lista candidaţilor la implant au fost incluşi 161 pacienţi - din care am implantat 17 (11 copii şi 6 adulţi).

Referindu-ne la cei 161 pacienti incluşi pe lista candidaţilor la implant, precizăm că selecţia acestora a presupus o evaluare complexă care a inclus - examenul complet ORL (inclusiv evaluarea funcţiei auditive), evaluare neurologică şi psihologică, explorări adiţionale în vederea depistării surdităţilor sindromice (EKG pentru sindromul Lange Nielsen), dozarea hormonilor tiroidieni şi ecografie tiroidiană (pentru sindromul Pendred), examen oftalmologic (pentru depistarea sindromului Usher, Cogan etc.), evaluarea funcţiei renale (pentru evidenţierea unui eventual sindrom Alport), evaluarea genetică, logopedică şi nu în ultimul rând, evaluarea imagistică a urechii medii, a urechii interne, a conductului auditiv intern precum şi a unghiului pentocerebral - prin CT şi RMN (cu scopul de a depista eventualele malformaţii ale cochleei şi de a aprecia (aspectul) starea nervului vestibulocochlear).

Conform protocolului standard preoperator toţi cei 161 pacienţi au fost protezaţi cu proteze auditive convenţionale şi reevaluaţi după 6 luni pentru a aprecia beneficiul adus de protezare.

Din cei 17 pacienţi, la 8 implantul a fost achiziţionat din bani publici, restul de 9 şi-au achiziţionat implantul din fonduri private.

La implantarea tuturor pacienţilor s-a ţinut cont strict de indicaţiile standard ale implantării: prezenţa surdităţii bilaterale de cauză cochleară bilaterală, profundă sau totală, fără rezultat la 6 luni de la protezarea convenţională. La implantarea celor 8 pacienţi la care s-au utilizat banii publici, pe lângă indicaţiile prezentate mai sus, s-au avut în vedere factorii prognostici care garantează performanţele post implant.

Intervenţia chirurgicală s-a realizat în toate cazurile sub anestezie generală cu intubare orotraheală şi a durat între 90 şi 180 minute. Abordul cochleei s-a realizat prin mastoidectomie şi timpanotomie posterioară, care au permis efectuarea unei cochleostome prin care s-a introdus portelectrodul până la nivelul helicotremei. Din cele 4 tipuri principale de implante cochleare, aflate la ora actuală pe piaţă, am folosit 3 şi anume: Medel, Nucleus şi Digisonic.

După introducerea electrozilor s-au determinat pragurile reflexului stapedian şi NRT-ul (pentru Implant Cohlear Nucleus).

Toţi pacienţii au primit antibioterapie cu viză profilactică. Imediat postoperator s-a verificat radiologic poziţia electrodului în cohlee.

Implantul cohlear a fost deschis între a 4-a şi a 6-a săptămână, iar electrozii au fost reglaţi după un protocol standard la 1, 3, 6, 12 şi 24 luni după activarea electrozilor.

REZULTATE

Intervenţiile chirurgicale au decurs fără incidente.

Postoperator au existat două incidente: copilul R.M. de 4 ani a prezentat sindrom febril major, care s-a remis la întreruperea antibioterapiei, şi copilul A.C. a prezentat vertij şi pareză facială periferică tranzitorie, care s-au remis spontan complet în decurs de aproximativ 14 zile.

Perioada de reeducare logopedică a fost scurtă în cazul adulţilor - în medie 1 an. În prezent pacienţii implantaţi pentru surditate postlinguală prezintă o inteligibilitate vocală de 100%. Toţi aceşti pacienţi pot comunica prin telefon şi sunt integraţi in societate.

Cei 4 copii sub 4 ani cu surditate prelingual implantaţi din fondurile Programului Naţional reprezintă un grup omogen. Este remarcabil faptul că toţi aceşti copii sunt integraţi în grădiniţe normale şi urmează un program intens de educare logopedică individualizat.

În ceea ce priveşte rezultatele grupului care s-a autofinanţat, acestea au fost specifice fiecărui caz în parte. Pentru adultul A.I. de sex masculin de 35 ani, diagnosticat cu surditate prelingual, rezultatele implantării la 1 an sunt satisfacătoare pentru pacient şi familie, deoarece percepe şi răspunde la majoritatea stimulilor sonori din mediu, sesizează vorbirea. Celălalt adult este o tânără, de asemenea cu surditate prelingual, implantată la vârsta de 18 ani. Rezultatele post implantare sunt foarte bune: sesizează sunetele din mediu (praguri auditive tonale în câmp liber la 20 dB), prezintă o îmbunătăţire considerabilă a dicţiei şi a construcţiilor verbale şi o îmbunătăţire considerabilă a comunicării cu membrii familiei în casă, la distanţă, doar prin implant (fără suport vizual).

DISCUŢII

Implantul cohlear este un dispozitiv electronic care permite preluarea sunetelor din mediu, prelucrarea şi transformarea lor în impuls electric cu caracteristici specifice în vederea stimulării directe a nervului auditiv. Impulsurile electrice sunt transmise mai departe pe căile auditive centrale la scoarţa cerebrală în ariile temporale unde sunt transformate în senzaţie auditivă (6).

Până în prezent din cei 161 candidaţi la implant cohlear au fost implantaţi (din raţiuni financiare) doar 17 pacienţi: 11 copii şi 6 adulţi. Acest lot îl vom împărţi în două grupuri după un criteriu mai puţin obişnuit, şi anume după provenienţa fondurilor utilizate pentru achiziţionarea implantului cohlear: un prim grup alcătuit din cazuri implantate din bani publici – 8 cazuri şi un al doilea grup constituit din cazuri implantate din fonduri private – 9 cazuri.

În discutarea rezultatelor obţinute în urma implantării vom începe cu primul caz implantat care merită o atenţie specială prin prisma faptului că a fost primul implantat la noi în ţară. În momentul selectării acestui pacient au existat o serie de probleme:

1. Responsabilitatea deosebită - fiind vorba de o intervenţie care nu se mai efectuase, un eventual eşec s-ar fi răsfrânt nu numai asupra pacientului şi echipei, ci şi mai ales asupra ideei de implant;
2. Impactul vis à vis de comunitatea de surzi;
3. Interesul suscitat în specialitatea ORL prin aceasta procedură;

În acel moment am avut de ales între trei candidaţi:

1. N.A de sex feminin, în vârstă de 2 ani cu diagnosticul de hipoacuzie senzorineurală profundă bilaterală prelingual;
2. V.O de sex masculin, în vârstă de 20 ani cu diagnosticul de hipoacuzie senzorineurală profundă bilaterală postlingual secundară meningitei;
3. L.E. de sex feminin, în vârstă de 40 ani, cu diagnosticul de hipoacuzie senzorineurală profundă bilaterală postlingual brusc instalată.

Am ales candidatul la care am considerat că şansele de recuperare sunt maxime: motivat, inteligent, cu surditate postlingual recentă. Etiologia meningitică a surdităţii a reprezentat un factor decisiv deoarece, în aceste cazuri, există riscul osificării cochleei (7,8). Obliterarea lumenului cochleei face imposibilă inserţia electrozilor (9,10, 11,12,13). Intârzierea implantării în această situaţie – chiar şi cu o lună, ne-ar fi putut pune în această situaţie (14).

Am reuşit, într-un interval de 4 ani, să implantăm toţi aceşti 3 pacienţi, deoarece am considerat aceasta ca fiind o datorie de onoare.

Pacienţii din primul grup, implantaţi cu dispozitive achiziţionate din banii publici,

se caracterizează (15,16) prin faptul că la selecţia lor nu s-a urmărit numai respectarea criteriilor de implantare ci şi diminuarea factorilor prognostici negativi (17,18,19, 20). Pacienţii implantaţi au fost selectaţi astfel încât să existe şansele unor rezultate maxime post implant.

În cazul celor cu surditate prelingual factorii luaţi în consideraţie au fost:

- vârsta la implantare mai mică de 5 ani;
- dezvoltare psihomotorie conform vârstei – apreciată de neuropsihiatru şi psiholog;
- educaţie logopedică prealabilă concomitent cu protezarea convenţională bilaterală 6 luni preimplant;
- posibilitatea continuării educaţiei logopedice post implant;
- lipsa unor disabilităţi asociate;
- cohleea şi conductul auditiv intern de aspect normal la examenul CT şi RMN;
- să fie puternic motivate;
- susţinerea corespunzătoare din partea familiei.

În cazul celor cu surditate postlingual – factorul vârstă şi-a menţinut importanţa – timpul scurs de la debutul surdităţii şi până la implantare nu trebuie să depăşească jumătate din vârsta pacientului.

Se ştie că în cazul copiilor cu surditate congenitală, rezultatele post implant urmează o curbă continuu ascendentă cu câştiguri certe dar nu spectaculoase (21,22). Este evoluţia unui copil la care în cel mai bun caz se poate afirma că perioada de achiziţie a limbajului a fost decalată cu vârsta la care s-a facut implantarea (4 ani în cazurile noastre).

Cel de-al cincilea copil în vârstă de 6 ani reprezintă un caz deosebit. Deşi vârsta de 6 ani nu îl recomandă ca fiind un candidat la ,,medalia de aur", l-am implantat simţindu-ne datori prin faptul că nu am putut realiza implantarea în anul 2000. Un alt argument a fost reprezentat de sprijinul deosebit al familiei concretizat în reorientarea profesională a mamei, care a devenit logoped, dar şi de faptul că este un copil inteligent şi cooperant. Am considerat că prin performanţele posibile candidaţii ce întrunesc asemenea criterii pot aspira la ,,medalia de argint ". Rezultatele obţinute au justificat opţiunea noastră.

Cel de al doilea lot cuprinde pacienţii care şi-au procurat implantul din (re)surse financiare proprii. Toţi aceşti pacienţi au fost evaluaţi în clinică stabilindu-se indicaţia de implant cohlear cu respectarea criteriilor de implantare. Deşi îndeplineau criteriile de implantare (15,16) nu au putut beneficia de implant cohlear finanţat din banii publici, deoarece rezultatele anticipate post implant depind de o serie de factori prognostici (17,18,19,20), iar aceştia îi excludeau din grupul celor care potenţial ar fi obţinut cele mai bune performanţe.

Un caz interesant care merită discutat este adultul A.I. de 35 ani, diagnosticat cu surditate prelingual. Este un candidat la limita criteriilor de implantare deoarece nu a fost nici protezat nici demutizat înainte de a se prezenta în clinica noastră (23,24). Am indicat protezarea convenţională bilaterală timp de 6 luni şi tratament logopedic intensiv. După evaluarea rezultatelor protezării şi a tratamentului logopedic, dat fiind motivaţia puternică a pacientului şi suportul familial excelent am hotărât implantarea.

Deşi a făcut un enorm progres logopedic, fiind capabil să pronunţe multe cuvinte şi unele expresii, are reale dificultăţi în comunicarea fără labiolectură. Pacientul este foarte satisfăcut de implant, fiind un purtător continuu al implantului şi urmând programul de reabilitare logopedică cu mult interes (24).

Celălalt adult este o tânără, de asemenea cu surditate prelingual implantată la vârsta de 18,6 ani, demutizată din copilărie, fostă purtătoare de proteze auditive (ineficiente). Rezultatele post implantare sunt foarte bune, dacă ne referim la evenimente ce nu ar fi fost posibile fără implant. Se evidenţiază:

- sesizarea tuturor sunetelor din mediu aproape de nivelul normal (praguri auditive tonale în câmp liber la 20 dB)
- îmbunătăţirea considerabilă a dicţiei şi a construcţiilor verbale
- îmbunătăţirea considerabilă a comunicării cu membrii familiei în casă, la distanţă, doar prin implant (fără suport vizual)
- a devenit o purtătoare permanentă a implantului, în ciuda preocupării pentru aspectul estetic
- cea mai importantă performanţă – frecventând şcoala normală, a absolvit în acest an bacalaureatul.

Aceste 2 cazuri subliniază încă o dată ideea că vârsta reprezintă un factor de prognostic (24,25,26) şi nu un criteriu.

Experienţa celor 2 pacienţi adulţi cu surditate prelingvală implantaţi tardiv, ne face să nu interzicem şi să nu descurajăm pacienţii care doresc implantarea cohleară, ca singura şansă de îmbunătăţire a confortului lor de viaţă. Totuşi trebuie acordată o atenţie deosebită discuţiei cu aceşti pacienţi, care trebuie să precizeze clar limitele implantului cohlear în situaţia dată, pentru a nu da pacientului speranţe nefondate (23, 24,25). O altă problemă în acest caz este finanţarea din surse proprii a implantului, ştiut fiind faptul că în prezent programul naţional nu poate acoperi şi aceşti pacienţi.

Toţi pacienţii acceptă şi poartă implantul cohlear cu un nivel excelent de auz al tonurilor în câmp liber.

Diferenţele apar în situaţiile de comunicare: recunoaşterea mesajului vorbit şi producţia verbală. Acestea se datorează pe de o parte factorilor prognostici preimplant (vârsta la implantare, vârsta de debut a surdităţii), iar pe de altă parte factorilor prognostici postimplant (programul de reabilitare logopedică, familie, anturaj, motivaţie).

Recomandăm din aceste motive în cazul copiilor cu surditate prelingvală implantarea în jurul vârstei de 2 ani (18,20), ceea ce necesită un diagnostic precoce al surdităţii (program de screening naţional al hipoacuziei la nou-născuţi şi copii până la 2 ani) (27). Respectarea acestor condiţii presupune rezultate maxime ale implantului cohlear.

În cazul surdităţilor postlinguale la persoane cu abilităţi de comunicare, se recomandă implantarea cât mai apropiată de momentul instalării surdităţii (20,25). Cu cât această perioadă este mai lungă cu atât reeducarea post implant este mai dificilă, iar comunicarea va fi mai proastă.

CONCLUZII

Toate cazurile descrise mai sus conturează ideea că implantul cohlear a fost o alegere bună în cazurile respective şi că pacienţii au reuşit să atingă cel puţin performanţele prevăzute înaintea implantării pentru fiecare situaţie particulară dată.

Discutând problema reeducării post implant se impune formarea unor logopezi specializaţi în reabilitarea vocală post implantare, care să funcţioneze măcar în centrele de judeţ – în condiţiile existenţei unui program naţional de implant cohlear, care probabil în viitorii ani va satisface necesităţile de implantare pentru toate surdităţile prelinguale.

BIBLIOGRAFIE

1. Lieberman P. *Eve Spoke : Human Language and Human Evolution.* New York : W.W. Norton, 1998.
2. Deacon T. *The Symbolic Species : The Co-Evolution of Language and the Brain.* New York : W.W. Norton, 1997.
3. Corballis MC. *From Hand to Mouth : The Origins of Language.* Princeton : Princeton University Press, 2002.
4. Knapp ML, Hall JA. *Nonverbal Communication in Human Interaction*. Hbj College & School, 1996.

5. Davis MH, Johnsrude IS. Hearing speech sounds : Top-down influences on the interface between audition and speech perception. *Hear Res* 2007 ; 229 (1-2) : 132-147.
6. Clark GM. The multiple-channel cochlear implant : the interface between sound and the central nervous system for hearing, speech, and language in deaf people-a personal perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006 ; 361 (1469) : 791-810.
7. Hartnick CJ, Kim HH, Chute PM, Parisier SC. Preventing labyrinthitis ossificans : the role of steroids. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001 ; 127 (2) : 180-183.
8. Young NM, Hughes CA, Byrd SE, Darling C. Postmeningitic ossification in pediatric cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000 ; 122 (2) : 183-188.
9. Aso S, Gibson WP. Surgical techniques for insertion of a multi-electrode implant into a postmeningitic ossified cochlea. *Am J Otol* 1995 ; 16 (2) : 231-234.
10. Montandon PB, Boex C, Pelizzone M. Ineraid cochlear implant in the ossified cochlea : surgical techniques and results. *Am J Otol* 1994 ; 15 (6) : 748-751.
11. Cohen NL, Waltzman SB. Partial insertion of the nucleus multichannel cochlear implant : technique and results. *Am J Otol* 1993 ; 14 (4) : 357-361.
12. Anderson I, Pitterl M, Skarzynski H et al. Long-term data on children implanted with a short electrode array. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2005 ; 69 (2) : 157-164.
13. Rotteveel LJ, Snik AF, Vermeulen AM, Mylanus EA. Three-year follow-up of children with postmeningitic deafness and partial cochlear implant insertion. *Clin Otolaryngol* 2005 ; 30 (3) : 242-248.
14. Cohen N, Ramos A, Ramsden R, Baumgarten W. International consensus on meningitis and cochlear implants. *Acta Otolaryngol* 2005 ; 125 (9) : 916-917.
15. Dowell RC, Hollow R, Winton E. Outcomes for cochlear implant users with significant residual hearing : implications for selection criteria in children. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004 ; 130 (5) : 575-581.
16. Lenarz T. Related cochlear implants : selection criteria and shifting borders. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1998 ; 52 (3) : 183-199.
17. Fugain C, Vandenabbelle T, Monneron L, Garabedian EN, Meyer B, Chouard CH. Indications and results of cochlear implants in young children. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 1992 ; 109 (3) : 148-155.
18. Spivak LG, Waltzman SB. Performance of cochlear implant patients as a function of time. *J Speech Hear Res* 1990 ; 33 (3) : 511-519.
19. Lehnhardt E, Aschendorff A. Prognostic factors in 187 adults provided with the Nucleus cochlear mini-system 22. *Adv Otorhinolaryngol* 1993 ; 48 : 146-152.
20. El-Hakim H, Abdolell M, Mount RJ, Papsin BC, Harrison RV. Influence of age at implantation and of residual hearing on speech outcome measures after cochlear implantation : binary partitioning analysis. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 2002 ; 189 : 102-108.
21. Richter B, Eissele S, Laszig R, Lohle E. Receptive and expressive language skills of 106 children with a minimum of 2 years' experience in hearing with a cochlear implant. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002 ; 64 (2) : 111-125.
22. Eisenberg LS, Kirk KI, Thielemeir MA, Luxford WM, Cunningham JK. Cochlear implants in children : speech production and auditory discrimination. *Otolaryngol Clin N Am* 1986 ; 19 (2) : 409-421.
23. Snik AF, Makhdoum MJ, Vermeulen AM, Brokx JP, van den Broek P. The relation between age at the time of cochlear implantation and long-term speech perception abilities in congenitally deaf subjects. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1997 ; 41 (2) : 121-131.
24. Waltzman SB, Roland JT Jr, Cohen NL. Delayed implantation in congenitally deaf children and adults. *Otol Neurotol* 2002 ; 23 (3) : 333-340.
25. Tait ME, Nikolopoulos TP, Lutman ME. Age at implantation and development of vocal and auditory preverbal skills in implanted deaf children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007 ; 71 (4) : 603-610.
26. Waltzman SB, Cohen NL. Implantation of patients with prelingual long-term deafness. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1999 ; 177 : 84-87.
27. Olusanya BO, Swanepoel W, Chapchap MJ et al. Progress towards early detection services for infants with hearing loss in developing countries. *BMC Health Serv Res* 2007 ; 7 : 14-18.

EFICIENŢA "DRILLING"-ULUI OVARIAN PERCELIOSCOPIC LA PACIENTELE CU OVARE POLICHISTICE ŞI INFERTILITATE OVARIANĂ

Cristina David, Ivona Lupaşcu, Simina Vegheş
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr. T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Clinica a II-a Obstetrică -Ginecologie

LAPAROSCOPIC OVARIAN DRILLING IN IMPROVING THE THERAPY IN PATIENTS WITH POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME AND INFERTILITY (Abstract): The aim of this study was to demonstrate the efficiency of laparoscopic ovarian drilling in the treatment of Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) associated with infertility. **Material and methods**: We studied 54 patients with PCOS that also presented infertility and spaniomenorrhea. The PCOS was diagnosed by ultrasound in the 2-nd Clinic of Obstetrics and Gynaecology in Iaşi, using Bataglia and ASRM/ESHRE criteria. We selected 32 patients with PCOS and infertility, in which medical treatment with inductors of ovulation and Metformin failed and laparoscopy was indicated. In these patients we practiced bilateral laparoscopic ovarian drilling. **Results**: In the next 3 months the menstrual cycle became regulated and 3 of the patients became pregnant. Other 10 patients became pregnant in the next 9 months after laparoscopic ovarian drilling. **Conclusion**: PCOS associated with infertility should be laparoscopicaly treated because the effect is faster and the fertility prognosis is better. **Key words**: POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME, OVARIAN DRILLING, INFERTILITY

Sindromul ovarelor polichistice (SOPK) reflectă o disfuncţie hormonală complexă la femeile de vârstă reproductivă, având un spectru larg de manifestări clinice în care anovulaţia ocupă un loc principal. Consecinţa SOPK este infertilitatea de cauză ovariană, accentuată în contextul socio-economic actual de tendinţa femeilor de a amâna maternitatea, reducându-se astfel capitalul ovarian funcţional. În asemenea situaţii, când trebuie ţinut cont de factorul "timp", este necesară o conduită optimă şi rapidă- chirurgia minim invazivă.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul clinic prospectiv a fost efectuat în Clinica a II-a Obstetrică- Ginecologie Iaşi pe un lot de 54 de paciente diagnosticate cu SOPK pe baza examenului clinic (infertilitate, oligo-, spaniomenoree, hirsutism - 7,4%, obezitate - 16,6%, acnee - 22,2%), a determinărilor biochimice (LH crescut, androgeni crescuţi) şi a criteriilor ecografice (Bataglia - 2000, Societatea Americană de Medicină a Reproducerii - ASRM şi Societatea Europeană pentru Reproducere Umană şi Embriologie- ESHRE 2003) (1,2,3):

- suprafaţa ovariană mai mare de 8 cm^2;
- volumul ovarian mai mare de 10 cm^3;
- stroma ovariană cu ecogenitate crescută;
- foliculi atretici cu diametrul 2-9 mm dispuşi la periferia ovarului (mai mult de 12);
- indici de rezistenţă şi de pulsatilitate cu valori scăzute în circulaţia ovariană (4).

TABELUL I
Corelarea aspectelor ecografice cu inspecţia laparoscopică a ovarului

Corelaţia	r – coeficient de corelaţie Spearman	p
Ecografie *vs.* inspecţia laparoscopică a ovarelor	0,74414	p=0,002

Din acest lot a fost selectat lotul de studiu de 32 paciente cu ovare polichistice şi infertilitate de cauză ovariană. Selecţia pacientelor acestui lot, în vederea tratamentului laparoscopic, a fost realizată pe baza criteriilor ecografice Bataglia şi ASRM/ESHRE şi pe baza faptului că aceste paciente nu au obţinut o sarcină după 3 luni de tratament cu inductori de ovulaţie (Clomifen 50 mg/zi, zilele 3-7 ale ciclului menstrual) şi cu Metformin (500 mg x 2/zi).

De menţionat că aceste paciente nu prezentau altă cauză de infertilitate (cavitate uterină normală şi trompe uterine permeabile obiectivate prin histeroscopie şi histerosalpingografie, soţ fertil).

REZULTATE

Protocolul de evaluare ecografică preoperatorie a cuprins: aspectul ecografic al ovarelor (multipli foliculi cu dimensiuni de 2-9 mm, dispuşi la periferia ovarelor), volumul ovarelor (peste 10 cm^3), densitatea stromei (gradul II), vascularizaţia ovariană (IR şi IP cu valori reduse), vase intraovariene vizibile Doppler color în zilele 3-5 ale ciclului menstrual (4,5). Anovulaţia în timpul tratamentului cu Clomifen a fost obiectivată prin absenţa foliculului dominant la două examinări ecografice succesive şi aspectul de "repaus" al endometrului (4,20).

Tehnica laparoscopică aplicată. Primul timp operator a constat în inspecţia organelor genitale interne: uter, trompe uterine şi ovare.

Corelaţia între diagnosticul ecografic şi rezultatele inspecţiei laparoscopice a relevat aspecte previzibile (tab. I), datorită modalităţii standardizate de diagnostic ecografic (criteriile Battaglia şi ASRM/ESHRE).

Pragul de semnificaţie statistică de 0,002 confirmă concordanţa de diagnostic între ecografie şi inspecţia laparoscopică (fig. 1).

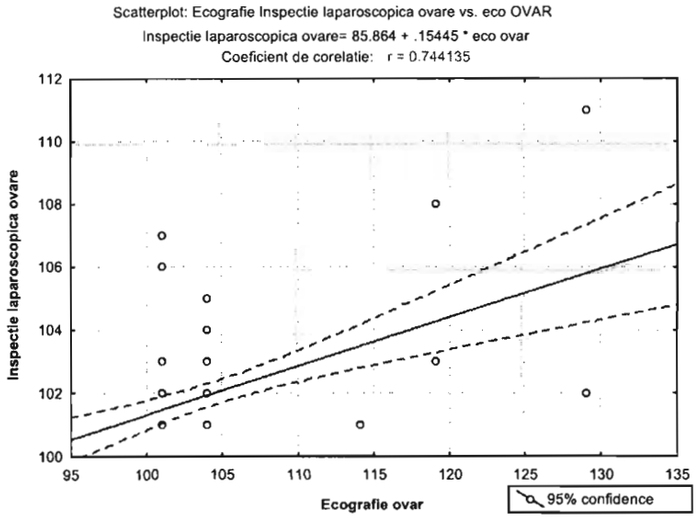


Fig. 1. Graficul corelaţiei: ecografie ovar *vs.* inspecţie laparoscopică

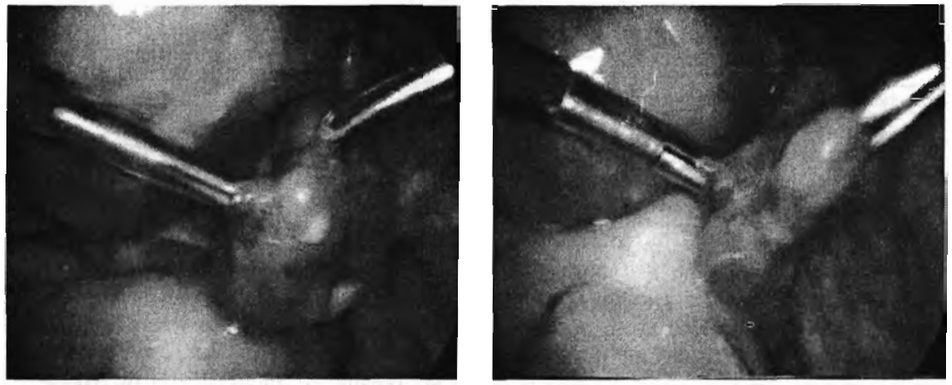


Fig. 2. Dye-test pozitiv (colecţia Prof. Ivona Lupaşcu)

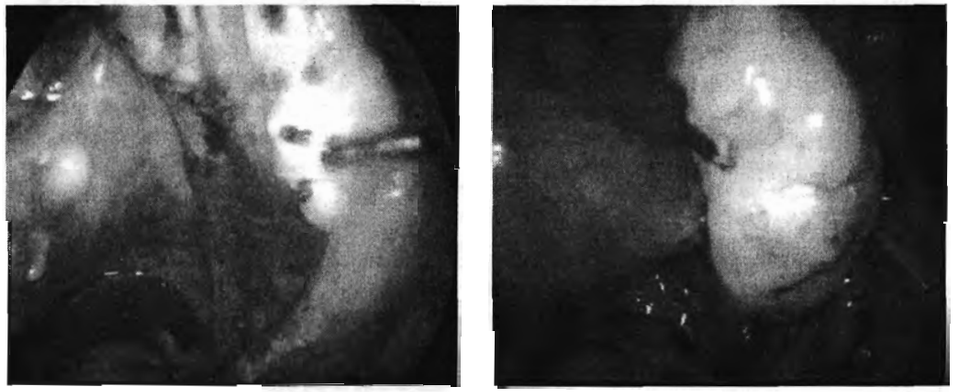


Fig. 3. Drilling ovarian
(colecţia Prof. Ivona Lupaşcu)

Fig. 4. Drilling ovar steinian
(colecţia Prof. Ivona Lupaşcu)

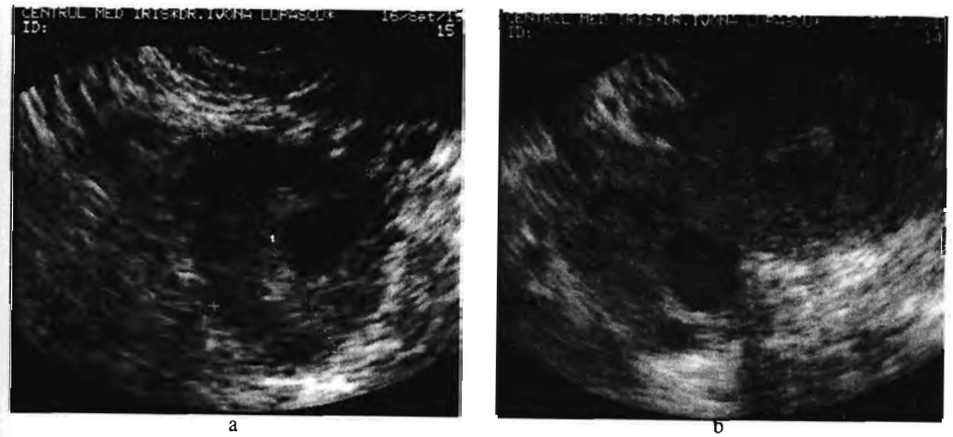
Următorul timp al laparoscopiei diagnostice a constat în efectuarea "dye"-testului cu albastru de metilen pentru verificarea permeabilităţii tubare (fig. 2). "Dye"-testul a fost pozitiv în toate cazurile deoarece în lotul de studiu au fost incluse numai pacientele cu infertilitate ovariană.

Laparoscopia operatorie a avut ca prim gest instilarea în pelvis a 300 ml de ser fiziologic care să determine flotarea ovarelor. În toate cazurile s-a practicat *"drilling"-ul ovarian* prin coagularea monopolară a fiecărui ovar 4 secunde în 5 - 10 locuri diferite cu un curent de 40 W (fig. 3). În cazul ovarelor steiniene cu corticala îngroşată au fost realizate 10- 15 orificii de "drilling", evitându-se rezecţia cuneiformă care poate determina ulterior aderenţa ovarului la organele învecinate (fig. 4).

La sfârşitul intervenţiei ovarele au fost lăsate să floteze în mediul de ser fiziologic pentru a preveni formarea aderenţelor şi pentru a evita efectele termice asupra organelor vecine.

Postoperator s-a recomandat mobilizarea precoce a pacientelor pentru profilaxia aderenţelor postoperatorii.

Protocolul de investigare postoperatorie a inclus ecografii endovaginale în zilele 12-16 ale ciclului menstrual, care au identificat prezenţa ovulaţiei în 80% din cazuri: folicul dominant cu diametrul de 20-22 mm



a b

Fig. 5. Monitorizarea ovulaţiei: a Folicul dominant- ziua a 12-a; b Folicul dominant şi „endometru adecvat"- ziua a 14-a (colecţia Prof. Ivona Lupaşcu)

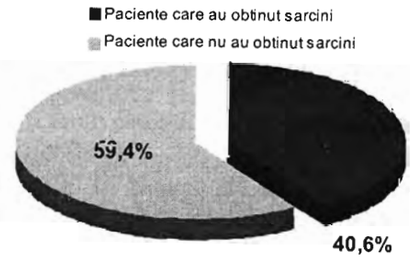


Fig. 6. Fertilitatea după tratamentul prin drilling ovarian laparoscopic

în zilele 11-14 ale ciclului menstrual şi corp progestativ (aspect stelat) după ziua a 16-a (fig. 5 a, b).

Eficienţa laparoscopiei a fost obiectivată imediat prin rata de fertilitate: 3 paciente au obţinut sarcini în primele 3 luni după intervenţie şi alte 10 în următoarele 6 luni, în total 41% din lotul de paciente la care s-a practicat "drilling" ovarian laparoscopic (fig. 6).

Procentul de sarcini obţinute în urma "drilling"-ului ovarian laparoscopic este similar celui menţionat în literatura de specialitate (între 40-60%) (2).

DISCUŢII

Ovarele polichistice reprezintă o entitate ecografică şi anatomo-patologică, care, asociată cu alte modificări clinice şi paraclinice, se constituie în diverse boli sau sindroame (6,7). Cele mai importante modificări în organismul femeii, cu repercusiuni asupra prognosticului de fertilitate se întâlnesc în sindromul ovarelor polichistice (8). Procentul mare de femei infertile cu ovare polichistice (0,6-4,3%) confirmă indirect ideea de bază a etiopatogeniei SOPK: un cerc vicios ce are ca efect anovulaţia (9).

Factorul determinant al acestui sindrom este reprezentat de hipersecreţia de LH hipofizar cauzată de deficitul unui factor nonsteroidian ovarian care în mod normal inhibă secreţia de LH. Hipersecreţia de LH determină hiperandrogenie de origine ovariană şi anovulaţie sau disovulaţie (10,11,12).

Lotul de studiu cu eşec al tratamentului cu inductori de ovulaţie şi Metformin a fost selectat în vederea îmbunătăţirii prognosticului fertil, printr-o metodă minim invazivă. Selectarea pacientelor a fost facilitată de aplicarea criteriilor ecografice de diagnostic al SOPK: ovare cu dimensiuni, volum şi suprafaţă crescute; imagini anecogene cu diametrul de 2-9 mm în număr mai mare de 12, dispuse la periferia ovarelor; stroma cu ecogenitate crescută; creşterea vascularizaţiei stromale (1,2,3).

Ecografia endovaginală şi examinarea Doppler au făcut posibilă studierea modificărilor vascularizaţiei intraovariene, atât în ciclul ovarian normal, cât şi în cazurile de patologie ovariană (3) conducând la un diagnostic mai precis. Tot pentru creşterea acurateţei diagnostice am folosit criterii ecografice suplimentare: indicele de sfericitate a ovarului mai mare de 0,7; raport uter-ovar în incidenţă transversală mai mic de 1 (1,2,3).

Diagnosticul de certitudine este cel laparoscopic: printr-un acces minim invaziv endoscopul permite identificarea aspectelor patologice ovariene. Un diagnostic complet trebuie să includă vizualizarea cavităţii peritoneale, a fundului de sac Douglas şi a ligamentelor utero-sacrate, a ovarelor pe toată suprafaţa lor şi a trompelor uterine; "dye" test-ul, este obligatoriu (13,14,15,16).

Standardul de aur în tratarea infertilităţii ovariene cauzată de ovarele polichistice tinde să devină laparoscopia: diatermia ovariană pe cale laparoscopică-drillingul ovarian-restabileşte sensibilitatea ovarului la hormonii gonadotropi şi scade secreţia de LH printr-un mecanism reflex (17).

Deoarece riscul de aderenţe postoperatorii există şi după tratamentul laparoscopic, unii autori recomandă ca numai pacientele infertile care nu au răspuns la tratamentul cu inductori de ovulaţie să fie candidate pentru tratamentul laparoscopic al SOPK (18). Alte variabile luate în discuţie ar fi: vârsta pacientei (cu înaintarea în vârstă se produce un declin fiziologic al fertilităţii) cât şi aspectul steinian al ovarelor (ovare mari cu capsula îngroşată incapabile de ovulaţie fie şi drog-indusă). Aceste paciente trebuie să beneficieze de tratament chirurgical fără a se mai încerca în prealabil stimularea medicamentoasă a ovulaţiei. Dacă reluarea ciclurilor menstruale ovulatorii nu se produce postoperator, atunci terapia cu inductori de ovulaţie poate fi reluată.

Studii recente au arătat o persistenţă a ciclurilor menstruale ovulatorii pe durata mai multor ani postoperator (19,20). Un număr de studii (2,15) a demonstrat eficienţa diatermiei ovariene, cu o rată a sarcinii variind între 50-80%.

În lotul studiat de noi şi tratat laparoscopic rata sarcinilor a fost de 40,62% după 9 luni de la intervenţie, aceste rezultate urmând să se îmbunătăţească cel puţin în următoarele luni datorită creşterii exponenţiale a desupresării ovarelor şi reluării ovulaţiei.

CONCLUZII

Drilling-ul ovarian devine standardul de aur în caz de eşec al terapiei cu inductori de ovulaţie datorită avantajelor pe care le prezintă: diagnostic corect şi complet, tratament minim invaziv şi eficient, risc scăzut de formare a aderenţelor.

Corelaţia pozitivă între drilling-ul laparoscopic şi rezultatele obţinute confirmă selectarea adecvată a cazurilor şi rolul important al laparoscopiei în rezolvarea minim invazivă a acestor cazuri.

Extinderea indicaţiilor de drilling laparoscopic la pacientele cu vîrstă peste 35 de ani sau cu ovare steiniene ar reprezenta un real succes în condiţiile în care rezultatele depind de gradul afectării ovariene.

BIBLIOGRAFIE

1. Battaglia C, Artini PG, D'Ambrogio G, Genazzani AD. The role of Color Doppler imaging in the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 108-113.
2. Marcus S. Polycystic Ovarian Syndrome. In: *www.ivf-infertility.com*, 2005.
3. Lupaşcu I. *Ecografia în ginecologie*. Iaşi: Ed. Junimea, 2005, 86-88.

4. Lupaşcu I, David C, Socolov D, Solomiţchi V. Hemodinamica în ovarele polichistice. *Revista Română de Endocrinologie şi Metabolism* 1994; 3 (1): 43-46.
5. Pedersen SD, Brar S, Faris P, Corenblum B. Polycystic Ovary Syndrome: validated questionnaire for use in diagnosis. *Can Fam Phys* 2007, 53 (6): 1042-1047.
6. Ghemigian A, Dumitrache C. Sindromul ovarelor polichistice - controverse şi certitudini etiopatogenice. *Gineco Ro* 2006; 6: 44-47.
7. Adams J, Polson DW, Flanks S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J* 1986; 293: 355-359.
8. Troyer K. Polycystic Ovarian Syndrome. *OBGIYN.net*, 2003.
9. Cussons JA, Bronwyn GA, Stuckey J, Walsh P, Burke V, Robert JN. PCOS -Marked differences between endocrinologists and gynecologists in diagnosis and management. *Clin Endocrinol* 2005, 62 (3): 289-295.
10. Birnbaum M. Polycystic Ovarian Syndrome. *OBGIYN.net*, 2003.
11. Scheiber MD. The fertility network: Polycystic Ovarian Disease. FACOG, 2002.
12. Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD. Clomiphene, Metformin, or both for infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med* 2007, 356 (6): 551-556.
13. Mencaglia L, Wattiez A. *Manual of Gynaecological Laparoscopic Surgery*. Tuttlingen: EndoPress, 2003, 120-123.
14. Peltecu Gh. *Chirurgie laparoscopică ginecologică, principii şi tehnici*. Bucureşti: Ed Bic All, 2001, 72-76.
15. Armar NA, Lachelin GCL. Laparoscopic ovarian diathermy: an effective treatment for anti-estrogen-resistant anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Br J Obstet Gynecol* 1993, 100: 161-164.
16. Naether OGJ, Fisher R, Weise HG et al. Laparoscopic electrocoagulation of the ovarian surface in infertile patients with polycystic ovary disease. *Fertil Steril*, 1993; 60: 88-94.
17. Gyonnaess H. Polycystic ovarian syndrome treated by electrocautery through the laparoscope. *Fertil Steril* 1984, 41: 20-25.
18. Sawin S. Laparoscopic ovarian cautery (drilling): A surgical approach to assist ovulation. *OBGIYN.net*, 2007.
19. Stegman BJ et al. Characteristics predictive of response to ovarian diathermy in women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2003, 188 (5): 1171-1173.
20. *** Management of infertility caused by ovulatory dysfunction. American College of Obstetricians and Gynecologists Practice Bulletin 34. *Obstet Gynecol* 2002, 99 (2): 347-358.

ANESTEZIA CAUDALĂ ÎN CHIRURGIA PEDIATRICĂ EXPERIENŢA NOASTRĂ PE 150 DE CAZURI

G.S.Aprodu, V. Munteanu, Georgiana Filciu, D.G. Goţia
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
Spitalul clinic "Sf. Maria" Iaşi
Clinica de Chirurgie şi Ortopedie Pediatrică

CAUDAL ANESTHESIA IN PEDIATRIC SURGERY (Abstract): The study analyses the efficacy and the safety of caudal anesthesia for the intra and postoperative pain management in children. **Material and method**: A retrospective study was conducted over a five years period enrolling 150 children scheduled for various surgical procedures. We used the standard technique ("loss of resistence", "single shot", lateral decubitus). **Results**: The most important age groups were 1month - 1 year, 64 cases (42.66%) and 1-6 years - 71 cases (47.33%). We performed 144 caudal blocks associated with general anesthesia, 3 associated with sedation and 3 simple caudal blocks. In 129 cases, we used bupivacaine 0.25% as a single analgetic substance, in five cases bupivacaine 0.25% associated to lidocaine 1%, and in 16 cases bupivacaine 0.25% associated to fentanyl 1 mcg/kg. The quality of the analgesia was very good in 128 cases (85.33%), good in 12 (8%) and poor in 10 cases (6.66%). The morbidity rate was 13.33% (20 cases), the most frequent complication being the urinary retention (8 cases - 5.33%). **Conclusions**: The caudal block is an efficient procedure for intra and postoperative analgesia in children. Associated with general anesthesia it is very useful for the management of the age groups 1 month - 1 year and 1-6 years. **Key words**: CAUDAL ANAESTHESIA, BUPIVACAINE, CHILDREN

Blocul caudal epidural este cea mai frecventă anestezie regională la copil, fiind folosit în combinaţie cu anestezia generală, în special în ortopedia pediatrică şi chirurgia viscerală abdominală subombilicală (1).

Structurile anatomice sunt bine definite la copil iar absenţa grăsimii presacrate face ca abordul spaţiului epidural prin ligamentul sacrococcigian să scadă riscul lezării structurilor neurale (2,3). Prima abordare a spaţiului epidural a fost cea caudală raportată de Sicard şi Cathelin (Paris, Franţa) în 1901. Douăzeci de ani mai târziu, în 1921 Fidel Pages (Madrid, Spania) publică rezultatele sale privind anestezia epidurală lombară în *Anestesia Metamerica* (2).

Studiul de faţă şi-a propus să evalueze rezultatele obţinute prin folosirea anesteziei caudale pentru controlul analgeziei intra şi postoperatorii la 150 de copii care au fost operaţi în Clinica de Chirurgie şi Ortopedie Pediatrică a Spitalului de Urgenţă pentru Copii „Sf. Maria" Iaşi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studiul este retrospectiv şi a fost efectuat în perioada octombrie 2001- august 2007, pe un lot de 150 copii, supuşi unor intervenţiei chirurgicale pentru diferite afecţiuni viscerale şi ortopedice. Toţi copii au avut risc anestezic I-II ASA.

Criteriile de excludere din studiu au fost cele uzuale pentru anestezia peridurală: tulburări de coagulare, tratament cu aspirină în ultimele 7 zile, lipsa acordului părinţilor, infecţii sacro-lombare ale pielii, sepsis, hipovolemie, afecţiuni neurologice preexistente, malformaţii ale coloanei sacrate. Toţi copii au fost premedicaţi cu 10 minute înainte de începerea anesteziei, cu midazolam iv, la care s-a adăugat atropină, la pacienţii cu vârsta mai mică de 3 ani.

Blocului caudal s-a efectuat prin tehnică clasică: s-au folosit ace Tuohy, Witacre sau Crawford de 22G cu bizou scurt de 3-5 cm lungime. Poziţia bolnavului a fost în decubit lateral, cu membrele inferioare uşor flectate pe abdomen. Ca repere anatomice s-au folosit spinele iliace postero-superioare, pliul interfesier, cornua sacralis. S-a utilizat metoda "pierderii rezistenţei", cu unică administrare de substanţă anestezică. Monitorizarea a fost cea standard pentru anestezia pediatrică: saturaţie în oxigen, electrocardiograma, frecvenţa respiratorie, tensiunea arterială măsurată non invaziv, temperatura centrală.

Evaluarea analgeziei s-a făcut diferit intra- şi postoperator. Intraoperator s-a monitorizat la 5 minute, tensiunea arterială şi pulsul. Anestezia a fost considerată ca foarte bună dacă variaţia acestora faţă de nivelul bazal a fost mai mică de 10%, bună dacă variaţia parametrilor a fost între 10% şi 20% şi inadecvată dacă variaţia lor a depăşit 20%. Postoperator, evaluarea s-a făcut printr-o scală subiectivă comportamentală, cu valori 0-3 (tab. I), la 30 min în primele 2 ore, orar în următoarele 24 de ore.

Parametrii urmăriţi în cadrul studiului au fost următorii: sex, vârstă, tipul intervenţiei chirurgicale, nivelul analgeziei, asocierea sau nu a blocului caudal cu anestezia generală balansată cu intubaţie orotraheală pe pivot inhalator, sau cu sedarea profundă pe respiraţie spontană, substanţa anestezică utilizată, calitatea analgeziei intra- şi postoperatorii, complicaţiile şi dificultăţiile tehnice.

TABELUL I
Scala de evaluare a analgeziei postoperator

Parametru urmărit	Scor
Copil liniştit / somn	0
Copil neliniştit / somn agitat	1
Uşoară agitaţie psihomotorie	2
Intensă agitaţie / plâns	3

REZULTATE

Din cei 150 de pacienţi, 68 (45,33%) au fost fetiţe iar 82 (54,67%) băieţi, fapt fără relevanţă pentru studiul nostru. Cele mai frecvente grupe de vârstă au fost cea de sugar 64 cazuri (42,66%) şi 1-6 ani 71 cazuri (47,33%), extremele fiind vârsta de nou născut 5 cazuri (3,33%) şi cea cu copii mai mari de 6 ani-10 cazuri (6,68%).

În ceea ce priveşte tipul de bloc caudal, la 144 de cazuri s-a făcut bloc caudal însoţit de anestezie generală balansată pe pivot inhalator cu sevofluran, 3 au avut bloc caudal cu sedare profundă, iar la 3 pacienţi s-a practicat numai bloc caudal.

Pentru realizarea blocului s-au utilizat următoarele substanţe anestezice: la 129 pacienţi (86%) s-a administrat bupivacaină în concentraţie de 0,25%, la 5 copii (3,33%) s-a folosit bupivacaină 0,25% şi xilină 1 %, iar la 16 pacienţi (10,67%) s-a administrat bupivacaină 0,25% şi fentanyl.

Intervenţiile chirurgicale au fost atât din chirurgie viscerală - 87 cazuri (58%), cât şi de ortopedie - 63 cazuri (42%).

Nivelul analgeziei a fost dictat de tipul intervenţiei chirurgicale şi a fost obţinut prin volum adecvat al substanţelor folosite (tab. II).

Calitatea analgeziei intraoperatorii a fost conform aşteptărilor, 128 pacienţi (85,33%) au avut o analgezie foarte bună, 12 copii (8%) bună şi 10 copii (6,67%) slabă.

Analgezia postoperatorie a fost diferită ca durată şi calitate, funcţie de substanţa analgetică folosită. Grupul cu cea mai mare stabilitate hemodinamică şi la care s-a observat o analgezie bună (scor analgetic 0-1)

TABELUL II

Repartiţia pe tipuri de intervenţii chirurgicale

Chirurgie viscerală	Nr. cazuri	Ortopedie	Nr. cazuri
Hernie	21	Fractură femur	3
TNC	13	Osteotomie femur	3
Fimoză	8	Luxaţie congenitală şold	21
Malf. anorectală	6	Fractură gambă	2
Megacolon	10	Osteotom. gambă	3
Plăgi perineale	5	Picior strâmb cong	31
Hipospadias	25		
Total	**87**		**63**

TABELUL III

Nivelul analgeziei corelat cu volumul de substanţă analgetică şi tipul intervenţiei chirurgicale

Nivel analgezie	Volum sustanţă analgezică	Tip operaţie	Nr cazuri
T7 – T8	1,2 ml / kg	Megacolon Malformaţii anorectale Testicul necoborât cong.	21
T10	1ml / kg	Hernie Fimoză Luxaţie şold cong. Fractură femur	81
L4 – L5	0,8 ml / kg	Op. în perineu Op. gambă/picior	48

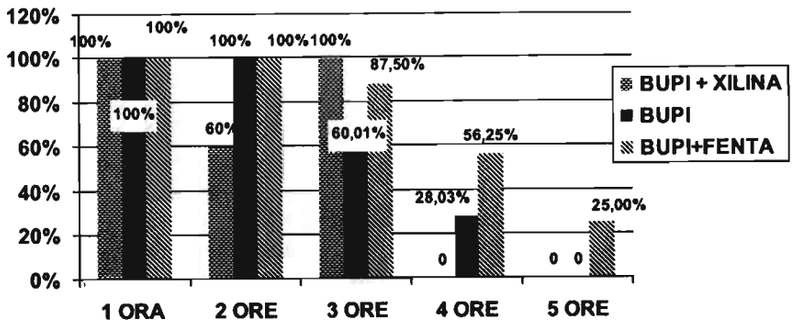


Fig. 1. Durata analgeziei postoperatorie pentru cele trei tipuri de droguri anestezice utilizate

şi la 5 ore postoperator a fost cel care a primit bupivacaină 0,25% în combinaţie cu fentanyl - 16 (10,66%) cazuri. La celelalte două grupuri la care s-a administrat bupivacaină 0,25% - 129 (86%) cazuri, respectiv bupivacaină 0,25% în amestec cu xilină – 5 (3,34%) cazuri, durata analgeziei postoperatorii a fost în medie 4 ore la acelaşi scor analgetic (fig. 1).

Dificultăţile tehnice au fost puţine, fiind prezente la 13 cazuri (8,66%). Acestea au constat în: injectare subcutanată (2 cazuri),

puncţia unui vas (1 caz), reperaj dificil (5 cazuri). Primele două situaţii au impus reluarea manevrei de abord peridural pe cale caudală.

Toţi cei 150 de copii au avut, în general, un rezultat postoperator bun în ceea ce priveşte blocul caudal. Totuşi, în evoluţia postoperatorie imediată, semnalăm o serie de complicaţii apărute: pareză vezicală - 8 cazuri (5,33%); hipotensiune arterială, bradicardie - 4 cazuri (2,66%); frison - 3 cazuri (2%); vărsături - 3 cazuri (2%); prurit - 2 cazuri (1,33%). Acestea au fost de mică amploare, corectabile prin măsuri terapeutice imediate.

DISCUŢII

Blocul caudal, ca orice tip de anestezie loco-regională, inhibă răspunsul organismului la stres cu scăderea nivelului plasmatic al cortizolului, epinefrinei şi norepinefrinei (1,2,4,10,11). Folosirea anesteziei regionale pentru analgezie intra şi postoperator este mult mai bună comparativ cu utilizarea intravenoasă a opioidelor şi a analgeticelor nonopioide. Utilizarea opioidelor intravenos e asociată la copii cu efecte adverse ca somnolenţă, greaţă, ileus. Totodată acestea pot întârzia reluarea activităţii normale şi externarea din spital (11).

Blocul caudal este cea mai frecventă tehnică de anestezie regională folosită la copii. Studiul efectuat confirmă siguranţa şi eficacitatea anesteziei caudale în asigurarea unei bune analgezii intra şi postoperatorii în intervenţiile subombilicale, fapt semnalat în numeroase studii recente care au abordat această temă (1,3,4,11,13).

Tehnica anesteziei caudale este sigură şi uşor de realizat la copilul sub 6 ani comparativ cu copilul mare, la care pot apărea dificultăţi de abord a spaţiului peridural (11,14). Din cei 150 de copii incluşi în studiul nostru, 140 (93,33%) au avut vârsta sub 6 ani. Acest lucru este explicabil prin faptul că la grupa de vârsta mai mare de 6 ani abordul spaţiului epidural pe cale caudală este dificil prin îngustarea hiatusului sacrat datorită orizontalizării sacrului şi osificării membranei sacro-coccigiene (1,11,13).

Intervenţiile chirurgicale la care au fost supuşi copii ce au primit acest tip de anestezie au fost intervenţii de chirurgie viscerală subombilicală şi ortopedie a centurii pelvine şi a membrului inferior, indicaţii care se regăsesc şi în literatura de specialitate (1,3,4,13,14).

Blocul caudal poate fi realizat printr-o singură administrare sau prin introducerea unui cateter. Cateterul poate fi introdus orb, sub ghidaj ecografic sau prin stimulare electrică (7). Noi am preferat tehnica unei singure administrări pentru a evita riscul infecţiei care este cea mai importantă complicaţie ce apare în cazul plasării cateterului pe cale caudală (1). Dezavantajul tehnicii noastre a fost imposibilitatea asigurării unei analgezii mai mare de 6 ore în postoperator, fapt ce ar fi fost posibil în condiţiile plasării unui cateter pe cale caudală.

Anestezia caudală cel mai frecvent este asociată anesteziei generale balansate superficiale (opioide în doză mică), cu intubaţie orotraheală pe pivot inhalator cu sevofluran (1,3,11). Acest lucru a fost confirmat şi de studiul nostru, 144 (96%) de copii primind acest tip de anestezie combinată - generală balansată superficială pe pivot inhalator şi bloc caudal. Din întregul lot, 140 (93,33%) pacienţi au avut vârsta mai mică de 6 ani, fapt explicabil prin aceea că la această grupă de vârstă este extrem de greu ca, în absenţa anesteziei generale, să se obţină cooperarea pacientului pentru a se putea efectua blocul caudal.

Studiile de specialitate arată o superioritate a eficacităţii ropivacainei 0,25% comparativ cu bupivacaină în blocul caudal (8,9). Ropivacaina induce un bloc senzitiv similar bupivacainei, însă un bloc motor de intensitate şi durată mai scurtă. Totodată

ropivacaina are mai puţine efecte toxice asupra cordului şi sistemului nervos central (8). Efecte toxice reduse cardiovasculare similare ropivacainei are şi levobupivacaina, izomer al bupivacainei (9,12). În studiul nostru am folosit bupivacaina ca analgetic de bază în realizarea blocului caudal din considerente economice. Am acordat o atenţie deosebită evitării injectării intravasculare a bupivacainei cunoscută fiind toxicitatea cardiovasculară a acestui drog (8,9).

Concentraţia de bupivacainǎ folosită în studiul nostru a fost de 0,25%, concentraţie care asigură o analgezie de foarte bună calitate intraoperator şi în primele 4 - 6 ore postoperator. Am evitat folosirea concentraţiilor de 0,5% pentru a evita hipotensiunea arterială şi blocul motor remanent postoperator (1,3,11,14).

Pentru a grăbi instalarea anesteziei caudale şi a prelungi durata şi intensitatea blocului bupivacaina se poate asocia cu o serie de substanţe cum ar fi: Xilina 1% 3-5 mg/kg, Clonidină (agonist receptor α) - 2 μg/kg, Fentanyl - 1 μg/kg, Ketamină - 0,5 mg/kg, Neostigmină - 2 μg/kg (1,3,6,10,11,14). În studiul nostru s-a folosit bupivacainǎ 0,25% în administrare unică sau bupivacainǎ asociată cu alte substanţe adjuvante (fentanyl, xilinǎ 1%). Am utilizat xilina pentru scurtarea perioadei de instalare a blocului şi fentanylul pentru creşterea potenţei analgetice a bupivacainei şi a duratei blocului analgetic (6,11,14).

Volumul total de substanţă analgetică folosit a variat între 0,8 ml/kg şi 1,2 ml/kg, funcţie de nivelul analgetic dorit fără a depăşi însă doza potenţial toxică de 2,5 mg/kg. Am evitat utilizarea unor volume mai mari de 1,2 ml/kg dat fiind faptul că la aceste volume există posibilitatea blocării lanţului simpatic toracic cu hipotensiune şi bradicardie secundare severe (1,3,11,14).

La cei 150 de copii incluşi în studiu calitatea analgeziei intraoperatorii a fost foarte bună la 128 copii (85,33%), similară datelor din literatura (1,3,4,11,14). În ceea ce priveşte calitatea şi durata analgeziei postoperatorii, aceasta a variat funcţie de substanţa analgetică folosită (6,10,11,14). Având în vedere că la toţi copii s-a utilizat ca pivot bupivacaina 0,25%, analgezia a fost foarte bună în primele 4 ore postoperator la tot lotul studiat, excepţie făcând grupul de copii care a primit asociat şi fentanyl, la care analgezia foarte bună (scor analgetic 0-1) s-a prelungit până la 6 ore post operator. Aceste date concordă cu cele din literatura de specialitate (1,3,4,11,14).

Cea mai frecventă complicaţie postoperatorie, citată şi în literatură, a fost pareza vezicală observată la 8 pacienţii (5,33%) incluşi în studiu. Toţi cei 8 pacienţi au fost din grupul celor care au primit fentanyl ca adjuvant al bupivacainei, fiind citată această complicaţie legată de administrarea opiaceului în spaţiul peridural (1,6,10,11,14).

CONCLUZII

Blocul caudal este o metodă bună de analgezie intra şi postoperatorie. Este considerată de elecţie la sugar şi copil mic, fiind recomandabil a se asocia anesteziei generale. Ca modalitate de analgezie postoperatorie, scade morbiditatea şi necesarul de analgetice opioide asigurând, totodată, şi o mobilizare prococe. Nivelul analgeziei este controlabil şi depinde de volumul de substanţă analgetică injectată. Calitatea şi durata analgeziei postoperatorii depind de substanţa analgetică folosită. Complicaţiile blocului caudal sunt reduse, cea mai notabilă fiind pareza vezicală.

BIBLIOGRAFIE

1. Siddiqui A. Caudal blockade in children. *Techniques in Regional Anesthesia & Pain Management* 2007; 11: 23-27.
2. Mandabach MG. The history of epidural anesthesia. *American Society of Anesthesiology - Annual Meeting,* 2000.
3. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK. *Handbook of Clinical Anesthesia*. Philadelphia: Lippincot, Williams and Wilkins, 2006.
4. Brislin RP, Rose JB. Pediatric acute pain management. *Anesthesiology Clin N Am* 2005; 23: 789-814.
5. Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developments aspects. *Neuroscientist* 2001; 7: 246-257.
6. Almenrader N, Passariello M, D'Amico G. Caudal additives postoperative pain management in children: S (+)- Ketamine and neostigmine. *Ped Anesth* 2005; 15: 143-147.
7. Marhofer P, Frickey N. Ultrasonographic guidance in pediatric regional anesthesia. *Ped Anesth* 2007; 16: 1008-1018.
8. Da Conceicao MJ, Coelho L, Khalil M. Ropivacaine 0.25% compared with bupivacaine 0.25% by the caudal route. *Ped Anesth* 1999; 9: 229-233.
9. Groban L, Deal D, Vernon JC et al. Cardiac resuscitation after incremental overdosage with bupivacaine and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg* 2001; 92: 37-43.
10. Gaitini L, Vaida S, Somri M. Does the addition of fentanyl block have an effect on the plasma level of catecholamines in children? *Anesth Analg* 2000; 90: 1029-1033.
11. Dalens B, Hasnaoui A. Caudal anesthesia in pediatric surgery: success rate and adverse effects in 750 consecutive patients. *Anesth Analg* 1989; 68: 83-89.
12. Brockway MS, Bannister M, Clure JH. Comparison of extradural ropivacaine and bupivacaine *Br J Anaesth* 1991; 66: 31-37.
13. Rose JB, Logan DE. Pediatric pain assement. In: *Pediatric Anesthesia: the Requisites in Anesthesiology.* Philadelphia: Mosby Inc, 2004, 191-195.
14. Cairus C. Caudal anaesthesia in neonates and infants. *Anesth Analg* 1980; 35: 1136-1139.
15. Hansen TG, Henneberg SW, Wlather-Larsen S. Caudal bupivacaine supplemented with caudal or intravenous clonodine in children undergoing hypospadias repair: double-blind study. *Br J Anaesth* 2004; 92: 223-227.

NOUTĂŢI

NOI TENDINŢE ÎN TRATAMENTUL BOLII CHRON

Majoritatea pacienţilor care au boală Chron activă sunt trataţi iniţial cu corticosteroizi. Deşi acest tratament ameliorează simptomatologia, majoritatea pacienţilor devin rezistenţi sau dezvoltă dependenţă de corticosteroizi (utilizarea îndelungată a acestei terapii fiind asociată cu creşterea mortalităţii). În mai 2001 a început un studiu care a avut loc simultan la 18 spitale din Belgia, Olanda şi Germania având ca scop compararea eficacităţii terapiei convenţionale cu eficacitatea terapiei imunosupresoare combinate în cazul pacienţilor cu boală Chron care nu au primit anterior glucocorticoizi sau infliximab. În studiu au fost introduşi 133 pacienţi care au primit fie tratament convenţional fie tratament imunosupresiv (trei injecţii cu infliximab, în săptămâna 0, 2, şi 6 şi azatioprină). După doi ani în care s-a urmărit remisiunea bolii fără tratament cu corticosteroizi, s-a concluzionat că terapia imunosupresivă a fost mai eficientă decât terapia convenţională, recomandându-se introducerea tratamentului imunosupresiv cât mai precoce (D'Haens G et al. Early combined immunosuppression or conventional management in patients with newly diagnosed Crohn's disease: an open randomised trial. *Lancet* 2008; 371: 660-667).

Ecaterina Enache

FIBROM UTERIN GIGANT. PREZENTARE DE CAZ

E. Crauciuc[1], Simona Niculescu[1], R. Balan[1], Nela Amălinei[2], Corina Flaişer[1], Şt. Buţureanu[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Clinica a III-a Obstetrică-Ginecologie
2 Disciplina de Histologie

GIANT UTERINE FIBROMA. CASE REPORT (Abstract): The presence of the giant abdominal-pelvic tumours is more and more rare because of the precocious methods of diagnosis. Sometimes the rare cases of giant uterine fibroma are met in medical practice and they need the use of atipical surgical techniques that are not entirely risk-free. In the present case, the giant uterine fibroma that was diagnosed (23/21/20 cm) was clinically, imagistic and pathologic investigated, then it underwent a surgical procedure in two times, with major difficulties, because the entire anatomical structure of the pelvis was totally modified. **Key words**: UTERINE FIBROMA, SURGICAL TECHNIQUE

Pacienta B.M. în vârstă de 50 de ani, din mediul rural, fără ocupaţie, se internează în Clinica a III-a Obstetrică-Ginecologie pentru: creşterea rapidă de volum a abdomenului, menoragii repetate de aproximativ 6 luni (episoade de sângerare pe căile genitale externe ce apar neregulat, în cantitate excesivă şi cu durată prelungită a fluxului > 5 zile); senzaţie de greutate şi dureri pelvine; tulburări de tranzit şi polakiurie, anxietate şi stare de oboseală excesivă, moderată dispnee.

Antecedecentele heredo-colaterale, cele fiziologice şi obstetricale sunt nesemnificative. La internare bolnava prezintă stare generală relativ bună; examenul pe aparate şi sisteme remarcă: varice hidrostatice gradul II membrul inferior stâng. Examenul ginecologic decelează: tumoră abdomino-pelvină dură, neregulată, contur boselat, consistenţă fermă, dureroasă la palpare, cu mobilitate redusă, ce depăşeşte cu 7 cm orizontala ce trece prin ombilic. La examenul vaginal cu valve: col uterin mărit de volum în poziţie intermediară; la examenul vaginal digital: bloc tumoral pelvin gigant cu anexe nepalpabile. Ecografia abdominală indică o formaţiune tumorală hiperecogenă, neomogenă, bine delimitată, de dimensiuni 23/21/20 cm, cu zone hiperecogene, anexe dificil de vizualizat, absenţa lichidului liber în cavitatea peritoneală, ficatul, splina şi colecistul normale, iar rinichii prezentau imagini de hidronefroză grad I bilaterală, prin compresie; frotiul citodiagnostic Babeş-Papanicolaou - clasa II inflamator; chiuretaj uterin biopsic - hiperplazie endometrială simplă, fără atipii celulare. Explorările de laborator au arătat o anemie uşoară.

Diagnostic

Pe baza datelor clinice şi paraclinice se stabileşte diagnosticul de uter polifibromatos gigant - pentru care se intervine chirurgical (1,2,3).

Tratament

Se practică histerectomie totală cu anexectomie bilaterală în doi timpi (histerectomie subtotală şi apoi totalizarea) datorită dimensiunilor mari ale tumorii. Se extrage

formaţiunea de dimensiuni 23/21/20 cm, cu greutate de 5,2 kg. Evoluţia postoperatorie este favorabilă, cu suprimarea tubului de dren în ziua a 5-a postoperator, reluarea progresivă a alimentaţiei şi a tranzitului, externare ca vindecată postoperator în ziua a 7-a.

Examen anatomopatologic

Macroscopic: Piesă operatorie de histerectomie totală, măsurând 23/21/20 cm; pe secţiune endometrul are dimensiunea de 22 mm iar nodulul subseros măsoară 9/12/6 cm, de culoare gălbuie, consistenţă moale, contur neregulat şi cu zone hemoragice (fig. 1). Se observa multiplii noduli subseroşi şi intramurali, cu diametrul variind între 2 şi 4 cm şi un polip endometrial intracavitar, cu diametrul de 1 cm (fig. 2).

Microscopic: Fragmentele de tumoră prezentau grupuri sau cordoane de celule rotunde sau poligonale, cu nuclei rotunzi, relativ mari, situaţi central, care alternau cu fasciculele spiralate, anastomozate de celule musculare netede fuziforme (fig. 3). Majoritatea celulelor grupate aveau aspect de celule clare, poligonale, cu citoplasmă clară abundentă şi membrane celulare bine definite. Unele celule prezentau nucleul excentric, realizând aspectul de celule „în inel cu pecete". Ariile plexiforme erau reprezentate prin cordoane sau cuiburi de celule rotunde, cu citoplasmă redusă (fig. 4). Leiomiomul prezenta arii hialinizate şi zone reduse cu modificări mixoide. Activitatea mitotică era foarte redusă (1-2MF/10HPF) şi nu prezenta arii de necroză. S-au observat focare de adenomioză la nivelul miometrului.

Diagnostic histopatologic: Leiomiom epitelioid mixt, cu celule clare şi plexiform.

Deşi în cazul raportat dimensiunea tumorii era mare (peste 6 cm), lipsa atipiilor citologice, a necrozei şi aproape în tota-

Fig. 1. Fibrom uterin gigant (piesa operatorie)

Fig. 2. Fibrom uterin gigant (după fixare şi secţionare)

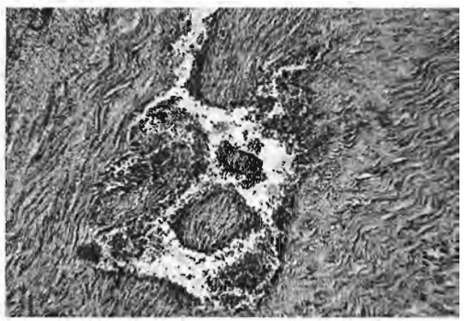


Fig. 3. Leiomiom epitelioid, fragmente musculare în lumen vascular, HE x20

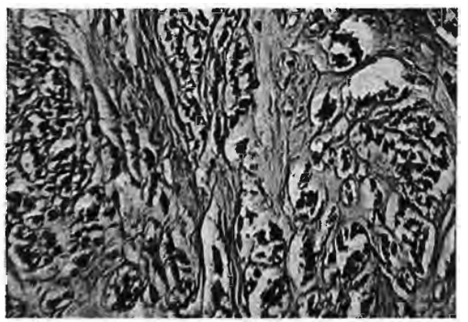


Fig. 4. Leiomiom epitelioid, arie de celule clare, HE x40

litate a figurilor mitotice fac leiomiomul epitelioid descris să intre în categoria celor cu comportament benign.

S-a identificat prezenţa unor mici mase musculare într-un lumen vascular venos, fapt care ridică problema fie a unei eventuale leiomiomatoze intravenoase, care ar putea fi prezentă într-un procent mai ridicat decât cel descris în literatura de specialitate, fie a existenţei „vaselor în vase" la nivelul miometrului: masele mici musculare intravasculare. Tehnici imunohistochimice pentru CD34 (endoteliu vascular) şi VEGFR-3 (celule endoteliale limfatice) ar putea susţine a doua ipoteză menţionată (4).

DISCUŢII

Problemele cele mai dificile care se pun în cazurile de tumoră pelvină gigantă nu sunt legate în primul rând de dimensiunea totală a uterului, cât de prezenţa fibroamelor incluse, adică acele tumori dezvoltate subperitoneal în interiorul zonelor de decolare ale peritoneului perivisceral, unde nu este de multe ori aplicabilă embolizarea arterei uterine (5,6,7)

Forgue scria în 1925 „chirurgul trebuie să aibă noţiuni foarte precise asupra zonelor decolabile ale peritoneului pelvin, asupra spaţiilor virtuale subseroase în care evoluează şi se dezvoltă aceste tumori, ca şi asupra deplasărilor viscerale care rezultă şi, drept urmare, asupra riscurilor de leziune, previzibile şi care trebuie evitate" (8).

În linii mari problemele tehnice se referă la posibilitatea existenţei unor aderenţe între uter/anexe şi organele din jur, prezenţa frecventă a unei vascularizaţii exuberante, care alimentează tumorile în creştere şi asupra leziunilor posibile ale organelor din vecinătatea aparatului genital feminin intern. Dezvoltarea unor tumori în mezometru determină formarea la periferia tumorii a unor planuri îngroşate, conjuctive şi musculare, care se multiplică în numeroase foiţe suprapuse. Pentru a ajunge la adevăratul plan de clivaj, uneori este necesar să fie traversate mai multe planuri. Problema tehnică este că aceste planuri pot include ureterul. Vasele care alimentează tumora pot fi numeroase şi voluminoase. Se descriu plexuri venoase cu dimensiunile cavei sau a venei femurale. Înainte de a acţiona în aceste zone este necesară ligatura lor. Înainte de operaţie trebuie avută în vedere o rezervă de sânge pentru o eventuală transfuzie. Ureterul este de multe ori victima unor tentative hazardate de ligatură a pediculilor uterini în cazul unor tumori gigante. Diferitele poziţionări ale fibroamelor pot împinge uterul de partea opusă, pot alungi vaginul, ridica vezica urinară chiar cu 10-15 cm deasupra simfizei; cele dezvoltate posterior pot obstrua tubul digestiv inferior şi apare pericolul unei delabrări importante a acestei zone, dacă nu se respectă anatomia locală. În cazurile neglijate, întreaga organizare a pelvisului poate fi modificată total (9,10,11,12).

Înainte de abord trebuie efectuată de multe ori o incizie prelungită paraombilical stâng. Recunoaşterea organelor este esenţială, cu evitarea deschiderii vezicii urinare la unghiul inferior al căii de abord abdominale. Opţiunea este de multe ori determinată de dimensiunile tumorii. Pentru a pătrunde în planul de clivaj trebuie mai întâi disecat ligamentul larg. Evitarea hemoragiilor se face păstrând un contact cât mai strâns cu suprafaţa tumorii. Aceeaşi strategie evită cel mai adesea şi leziunile ureterale.

În unele cazuri histerectomia subtotală executată la începutul intervenţiei, pornind de la „partea uşoară", deschide calea către o individualizare mai exactă a tumorii restante, iar totalizarea se face mai uşor (13). Se impune diagnosticul corect preoperator al formei anatomo-clinice, cât şi evidenţierea imagistică a structurilor majore pelvine.

CONCLUZII

Fibromul uterin este cea mai frecventă tumoră benignă. Originea tumorii se găseşte la nivelul elementelor musculare ale uterului. Histerectomia este una dintre cele mai frecvente proceduri chirurgicale: rata histerectomiei a variat între 6,1 şi 8,6 la 1000 de femei, indiferent de vârstă. Decizia de a efectua o histerectomie pentru un leiomiom se bazează pe necesitatea tratării simptomelor: sângerare uterină anormală, durere sau compresie pelvină. Alte indicaţii pentru histerectomie includ creşterea "rapidă" a dimensiunilor uterului (deşi acest semn nu este definit în mod clar), compresie ureterală sau dezvoltarea leiomiomului la menopauză. În medie, vârsta unei femei la care s-a efectuat histerectomie este de 42,7 ani, aceasta rămânând constantă în ultimile două decade. Frecvenţa fibromului gigant - care depăşeşte orizontala ombilicală - are o frecvenţă greu de definit.

BIBLIOGRAFIE

1. Schollmeyer T, Meinhold-Heerlein I, Walter C, Venhoff L, Müller-Hülsbeck S. Operative and interventional therapy of fibroids. *Ther Umsch* 2007; 64 (7): 353-363.
2. Lefebvre G, Vilos G, Allaire C et al. The management of uterine leiomyomas. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25 (5): 396-418.
3. Lefebvre G, Allaire C, Jeffrey J et al. SOGC clinical guidelines. Hysterectomy. *J Obstet Gynaecol Can* 2002; 24 (1): 37-61.
4. Merchant S, Malpica A, Deavers C et al. Vessels within vessels in the myometrium. *Am J Surg Pathol* 2002; 26 (2): 232-236.
5. Lumsden MA. Embolization versus myomectomy versus hysterectomy: which is best, when? *Hum Reprod* 2002; 17 (2): 253-259.
6. Ustünsöz B, Udurel MS, Bozlar U, Duru NK, Ustünsöz A. Is uterine artery embolization prior to myomectomy for giant fibroids helpful? *Diagn Interv Radiol* 2007; 13 (4): 210-212.
7. Powell JL. Giant fibroids. J Am Coll Surg 2004; 198 (5): 844-845.
8. Robert HG. *Nouveau Traite de Technique Chirurgicale*. Tome XIV. *Gynecologie*. Paris: Ed. Masson, 1977, 264-273.
9. Lazarov N, Lazarov L. Giant uterus myoma in patient of 84 years old. Case report and discussion. *Akush Ginekol* 2007; 46 (1): 48-49.
10. Costa Benavente L, Silva Barroso F, Avila Flores E. Giant uterine myoma. *Ginecol Obstet Mex* 2005; 73 (10): 563-565.
11. Oelsner G, Elizur SE, Frenkel Y, Carp H. Giant uterine tumors: two cases with different clinical presentations. *Obstet Gynecol* 2003; 101 (5 Pt 2): 1088-1091.
12. Nguyen-Duc H. Large uterine fibroma in a 15 year old adolescent. Giant leiomyoma in adolescence. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2003; 32 (8 Pt 1): 748-750.
13. Wu JJ, Xu BQ, Zhang Y. A case of giant cervix fibromyoma. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2000; 25 (6): 592-598.

NUTRIGENOMICS IN POSTGENOMIC ERA

E.V. Gorduza[1], L.L. Indrei[2], Valeria M. Gorduza[3]
"Gr.T. Popa" University of Medicine and Pharmacy Iaşi
School of Medicine
1 Department of Medical Genetics
School of Dental Medicine
2 Department of Hygiene and Nutrition
"Gh. Asachi" Technical University Iaşi
School of Chemical Engineering
3 Organic and Biochemical Engineering Department

NUTRIGENOMICS IN POSTGENOMIC ERA (Abstract): The last years modified major our conceptions about nutrition. These revolutionary changes were produced by implementation of new techniques of functional genomics. The nutrigenomics and *nutrigenetics* provide powerful approaches to unravel the complex relationships between bioactive molecules, genetic polymorphisms and biological system and can give rise to personalized nutrition and dietary recommendations. In monogenic diseases (phenylketonuria, galactosemia, lactose intolerance etc.) diet influence phenotypic expression and nutrigenomics will improve the prevention or treatment by the early identification of specific mutations or haplotype combinations that modulate dietary response in affected subjects. In the multifactor diseases, like cardiovascular diseases (CVD), obesity, type II diabetes mellitus or cancer, the nutrigenetic approach has begun to reveal that some of them are susceptible to dietary intervention and may modulate the onset and progression of disorders. **Key words**: NUTRIGENOMICS, DIET, GENOTYPE, MONOGENIC DISORDERS, MULTIFACTORIAL DISORDERS

Good nutrition is vital to health, optimal growth, development, and prevention of diseases. Classical research in nutrition, has been based on nutrient deficiencies and impairment of health. In our cells, the DNA is continuously under threat of genomic, chromosomal or genic mutations. In last years, the genomics revolution allowed the development of new technologies that can be applied to evaluate more comprehensively the molecular changes. The functional genomics, integrated by transcriptomics, metabolomics or proteomics increasing our understanding on how nutrients can modulate gene expression, provide exciting opportunities for simultaneously monitoring thousands of molecules involved in key pathways and evaluate the influence of foods on metabolic processes. Integration of information will lead to individual metabolic genotype and phenotype analysis and can give rise to personalized nutrition and dietary recommendations to help individuals maintain a healthier nutritional status and prevent chronic diseases (1,2,3,4,5,6,7,8, 9,10). The aim of our review is to make a synthesis of recent data in a new medical domain: nutrigenomics.

GENERAL CONSIDERATIONS

Suboptimal intakes of micronutrients is associated with cardiovascular disease (CVD) (B vitamins, vitamin E, carotenoids), cancer (folate, carotenoids), neural tube defects

(folate), and bone mass (vitamin D) (11). For example, B6, B12, and folate deficiencies, are associated with increased serum homocysteine levels, a risk factor and marker for coronary artery disease (12).

Dietary chemicals can affect gene expression, acting as ligands for transcription factor receptors, influencing metabolic pathways, or modulating signal pathways. Bioactive components of diet influence gene expression patterns (transcriptome), organization of the chromatin (epigenome), protein expression patterns, including post-translational modifications (proteome) and metabolite profiles (metabolome) (12,13,14).

The new terms, used in postgenomic era, can be define like these:

- *Genomics* allows the mapping, sequencing, and analysis of all genes present in the genome of a cell. Transcriptomics, using either cDNA or oligonucleotide microarray technology, describes the gene expression (mRNA) in a biological sample.
- *Proteomics* aims to characterize all proteins in a biological sample, including their abundance, distribution, post-translational modifications, functions, and interactions with other biological molecules.
- *Metabolomics*, or *metabonomics*, provide a quantitative analysis of all metabolites in an isolated cell system, tissue, or biological fluid (3,15,16,17).

The nutritional environment modifies the expression of genes, and depending upon the genotype, the metabolism of nutrients generates a different health status (18). The *nutrigenomics* and *nutrigenetics* provide a powerful approaches to unravel the complex relationships between bioactive molecules, genetic polymorphisms and biological system. The nutrigenetics analyses the impact of genetic variation on optimal dietary requirements (gene structure → diet). The nutrigenomics is focused on influnce of diet upon gene function (transcription and translation) and metabolism (diet → gene interactions) (5) (fig. 1, 2).

The conceptual basis of nutrigenomics research can be synthetise by:

- dietary components act on the genome and may alter structure or expression of genes;
- in some circumstances diet can be a risk factor for a disease;
- diet-regulates genes, determining initiation, progression, severity of diseases;
- the genetic structure modulate the diet influences in health and disease;
- "personalized" nutrition, correlated with nutritional requirements, nutrition status and genotype, can be used to prevent or cure chronic disease (5).

Understanding the genetic interactions in monogenic diseases relieves the more

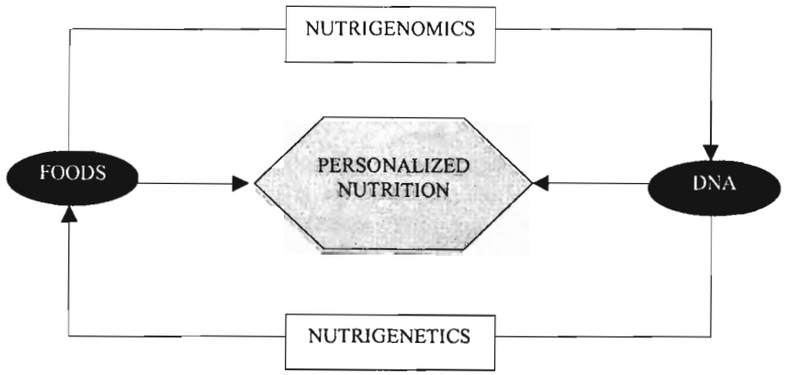


Fig. 1. Relationship between nutrigenomics and nutrigenetics

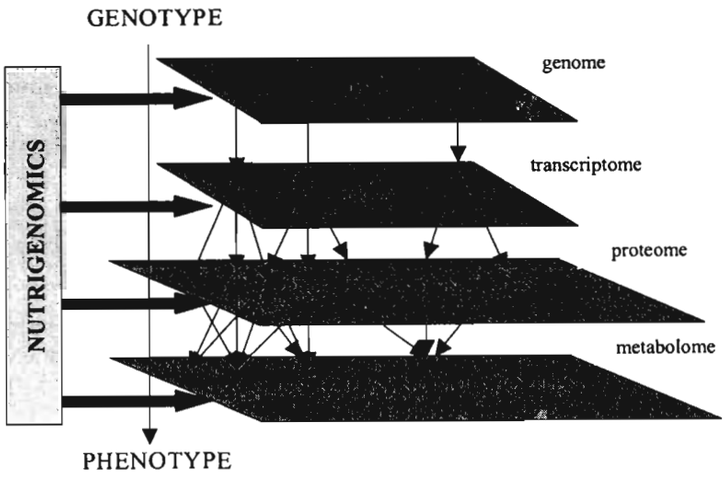


Fig. 2. Interrelationship between different *„omics"*

complex interactions between genes and environmental factors involved in the phenotypic expression of multifactorial diseases (19). Now, we know around 1,000 genes causing human diseases, 97% of them being associated with monogenic diseases (20). In chronic diseases (i.e. CVD, diabetes or cancer), pathogenic process depends on interactions between several genes and environmental factors (21). In these conditions, the research is difficult and the ideal candidate genes should be those that are chronically activated during a disease and have been demonstrated to be sensitive to dietary intervention. Also, in nutrigenomics field, the research must be focused on DNA polymorphisms (i.e. SNPs - single nucleotide polymorphisms) highly prevalent in the population or on the genes associated with biomarkers rendering clinical trials facile (5).

MONOGENIC DISORDERS MODULATE BY NUTRIGENETICS

In some monogenic diseases (phenylketonuria, galactosemia etc.) diet influence phenotypic expression and dietary modification has been largely used to prevent the development of the disease. In these diseases, nutrigenomics will improve the prevention or treatment by the early identification of specific mutations or haplotype combinations that modulate dietary response in affected subjects (19).

Phenylketonuria

Phenylketonuria (PKU) is an autosomal recessive (AR) disorder resulting from phenylalanine hydroxylase deficiency (19). PKU affects in 1/10,000 of Caucasians. Using a newborn screening program, based on the detection of hyperphenylalaninemia (HP), the diagnosis can be made in neonate. The main clinical features is a severe mental retardation. The treatment of PKU consists of a Phe-restricted diet supplemented with a tyrosine, vitamin, and oligoelement enriched amino acid mixture (22).

The European Multicenter Study of PAH deficiency classified 105 mutations in the PAH gene, providing a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. The common mutations are: R408W in Eastern Europe and UK, IVS12+1G>A in Denmark and England, IVS10-11G>A in the Mediterranean, Y414C in Scandinavia, and I65T in Western Europe (23). The different residual activity of enzyme, modulate

by diet, explains the variable phenotype in patients with similar genotypes (24). The nutrigenomics studies will allow the appropriate biomarkers to provide a personalized therapy (19).

Galactosemia

Galactosemia, a complex trait whit multiple developmental and metabolic abnormalities, affects 1:40,000 live births. This AR disorder of galactose metabolism, is produced by a deficiency of galactose-1-phosphate uridyltransferase (GALT), galactokinase or uridine-diphosphate galactose-4-epimerase. The diagnosis in the neonate is based on failure to thrive, feeding difficulties, and prolonged conjugated hyperbilirubinemia. Galactosemia can be fatal if a lactose-/galactose-restricted diet is not introduced. The diet ameliorates immediate prognostic in children, but fails to prevent long-term complications. A possible explanation is the activation of alternate metabolic pathways involving galactiol and galactonate formation (25).

Allelic variation at the GALT gene modifies the phenotype. The most frequent mutations Q188R and K285N are associated with a complete loss in enzyme activity and, thus, a more severe biochemical phenotype (26).

Lactose intolerance

The shortage of the lactase (LCH), produced by cells of small intestine, generates an impossibility of break down the lactose, inducing a lactose intolerance. The disease is less frequent in northern European (15%) but much frequent in Afro-Americans (80%) Hispanics (80%) or Asians (>95%). Lactase deficiency develops naturally, after age of 2 years. Nausea, flatulence, meteorism, and diarrhea appear when fresh milk is consumed (19).

It exists four common haplotypes (A, B, C, and U) generated by point mutations and recombination. A C13910T SNP located 14 kb upstream of the LCH is associated with lactase persistence. The persistence of this variant in populations may confer selective advantages that include improved nutrition, prevention of dehydration, and ameliorated calcium absorption (individuals with lactose intolerance are at greater risk of osteoporosis) (27,28).

Celiac disease

Celiac disease is a multifactorial disorder, with a strong genetic component, that affects 1/120- 300 subjects in Europe and North America. It results from a permanent intolerance to ingested gluten (or cereal prolamins) in genetically predisposed individuals. The pathogenic process implies an immunological-mediated inflammatory damage of gut mucosa, with secondary malabsorption. The signs are diarrhea, steatorrhea, and loss of weight or failure to thrive (19).

This disease is associated with HLA-DQ2/8 haplotypes. After gluten sequences binding to HLA-DQ2/8 antigens, follows modification of gluten peptides, by the transglutaminase that can induce T-cell responses (29,30). The treatment of choice, difficult to apply, requires a gluten-free diet excluding all cereals. Nutrigenomics will evaluate the feasibility, efficacy, and risks of any dietary approach tailored for treating celiac disease (19).

Familial hypercholesterolemia

Familial hypercholesterolemia (FH) is a autosomal dominant disorder of lipoprotein metabolism, in which dietary and environmental factors can strongly modulate manifestation. FH affects 1/500 people and it is caused by a mutation in the gene of low-density lipoprotein (LDL) receptor (*LDLR*). The mutations reduce number of functional LDL receptors, with defective uptake of plasma LDL and dramatic elevation in plasma LDL cholesterol levels (19).

The disease is characterized by the presence of xanthomas, xanthelasmata, *arcus lipoides corneae,* and an excessive depo-

sition of cholesterol in arterial walls, which leads to atherosclerosis and premature CVD. The mean age of onset for CVD is 40-45 years in male and 50-55 years in female FH patients. At least 75% of untreated male FH patients present a coronary artery disease (CAD) before age 60 (31). The severity of the specific mutation in LDLR gene explains the variable expression in terms of onset and severity of CAD (19).

The clinical presentation differs even among individuals who share an identical gene defect. Additional factors that influence the course of FH are the gene-environment and/or gene-gene interactions (32,32).

Serum cholesterol is a polygenic trait, with 54% heritability, that explains the large range of serum cholesterol level (248-426 mg/dl) in heterozygote after a low-fat diet without drugs (33). Analysis of pedigree in family with FH reveals a large clinical variability that suggests a strong interaction with environmental factors. Age, sex, LDL cholesterol levels, and a positive family history for premature atherosclerosis are the most important determinants for early and severe forms. The studies of FH demonstrate that environmental and genetic factors are both important, and nutrigenomics can allow benefits in future (19).

COMPLEX DISORDERS MODULATE BY NUTRIGENETICS

The multifactorial disorders arise from dysfunctional biological networks produced by interactions of genetic and environmental factors. In these diseases, dietary intervention in profilaxy is a complex and ambitious goal that requires not only knowledge of how a single nutrient may affect a biological system, but also how the hole diet modulate biological functions (3).

The nutritional management of complex disease (diabetes, obesity or cancer) provides a mechanistic foundation for nutritional pharmacology. For example, in metabolic syndrome, because the number of sites of biological intervention capable of bringing about clinically meaningful changes in lipid and lipoprotein metabolism is limited, it is perhaps not surprising that drugs and nutrients tend to overlap in their sites and mechanisms of action (34). The response of patients to drugs depends to SNPs, and the genetic polymorphisms may also influnces the response to nutrients (35).

Cardio-vascular diseases

Cardio-vascular diseases encompass multiple genetic and environmental risk factors. In Europe, every 5th man or woman is affected by CVD resulting in a mean death toll of almost 4,500 per day. A *summum* of these risks is the metabolic syndrome, characterized by obesity, dyslipidemia, hyperglycemia, and hypertension. This affects 24% of the population at 20 years of age and 40% of people older than 60 years of age. With the exception of smoking, age and family history, all other risk factors for myocardial infarction (MI) in men depend considerably on dietary habits. Total cholesterol and LDL cholesterol is significantly lower in lean than in obese men, particularly at youngers (4,19).

The variation in plasma lipids, by diets low in fat and cholesterol, has a genetic component. Lipid metabolism comprises biological pathways that contain multiple steps. Lipid homeostasis implies the coordinated action of numerous nuclear factors, binding proteins, apolipoproteins, enzymes, and receptors. These processes are linked with energy metabolism and are under hormonal controls that adjust the environmental and internal conditions. Many candidate genes have been reported to be associated with CVD. The mutations in genes that codify these components result in abnormal lipid metabolism that may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. A nutrigenetic approach has begun to reveal that some of them, are susceptible to

dietary intervention and may modulate the onset of CVD (19).

Apolipoprotein E. Seric ApoE is associated with chylomicrons, VLDL or HDL, and serves as a ligand for multiple lipoprotein receptors. Genetic variation at the apoE locus is represent by three alleles: E4, E3, E2. Plasma cholesterol, LDL cholesterol, and apoB levels are highest in subjects carrying the apoE4, intermediate in those with the apoE3, and lowest in those with the apoE2 isoform. Significant diet–apoE gene interactions, modulate by cholesterol, was observed only in men, suggesting a significant gene-sex interaction (19).

Apolipoprotein A-IV. The glycoprotein Apo A-IV, synthesized by intestinal enterocytes during lipid absorption, is incorporated into nascent chylomicrons. The common isoform is apo A-IV-1. By a Q360H substitution in *APOA4* gene results the apo A-IV-2, that is associated with higher levels of HDL-cholesterol, lower triglyceride (TG) levels, lower LDL-cholesterol, lower Lp(a), and higher fasting glucose and insulin levels (19,36,37,38). If dietary total fat intake is moderate and constant, Q/H subjects display an attenuated response of LDL-cholesterol. However, when dietary cholesterol intake is changed in the setting of a higher baseline dietary fat intake or with a change in fat saturation, the fatty acid effects on LDL levels predominate and overrule the allele effect (19). The impact of the Q360H polymorphism on cholesterol absorption may be greater on a high polyunsaturated fatty acids (PUFAs) intake. When total fat intake is raised or lowered, Q/H subjects have an exaggerated response in plasma HDL levels, effect that is amplify by a high-PUFA intake (39,40). Thus, the final effect of apo AIV alleles on the LDL response to dietary cholesterol may be determined by the relative amounts of cholesterol, saturated fatty acids (SAFAs), and PUFAs in the diet (19).

Apolipoprotein A-I. ApoA-I is the major apolipoprotein of HDL, representing 70-80% of HDL mass, and participate in cholesterol efflux mediated by ABCA1 to HDL particles (41). HDL-C levels, is influenced by consumption of PUFA, according to polymorphisms in the promoter region (-75 G/A) of Apo A1 gene. Carriers of the A allele have an increase HDL-C levels after consumption of PUFA. In contrast, those with the common G allele presented an inverse relationship with HDL-C levels. This effect was also influenced by sex, with women presenting higher HDL-C levels when fed low quantities of PUFA (42). It is clear that subjects with the A-allele (G/A) will benefit from diets containing a high percentage of PUFA (i.e., vegetable oils, fish, nuts) that growth-up level of HDL-C concentrations, which low CVD risk. The influence of PUFA is intermediate by transcription factors, which may bind to a region within or close to the polymorphic site of APOA1 (19).

Hepatic lipase (HL) is a plasma lipolytic enzyme that metabolites LDL to HDL. HL deficiency is characterized by an impaired metabolism of postprandial triglyceride-rich lipoproteins, which may result in premature atherosclerosis. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the 5'-flanking region of the HL gene (-763(A/G),-710(T/C),-514(C/T), -250(G/A)) define a haplotype associated with variation in HL activity and HDL-cholesterol levels. Homozygosity for allele AA is associated with a lower HL activity and a higher HDL2-cholesterol. Subjects with CC genotype react to fat from diets by increasing the concentrations of HDL-cholesterol, maintaining the homeostasis of lipoprotein metabolism. Carriers of the TT genotype (frequent in afro-americans) cannot decrease the HDL-cholesterol levels that explain the impaired ability of this ethnic group to adapt to new nutritional environments. In addition, the

polymorphism of HL is important in some gene-drug interactions. For example, subjects with the CC genotype had a greater decrease in HL activity compared with carriers of the T-allele, after a lipid-lowering therapy (19).

Lipoprotein-lipase (LPL) catalyses the hydrolysis of TGs present in circulating chylomicrons and VLDL particles, providing nonesterified fatty acids and 2-monoacylglycerol for tissue utilization. Dysfunctional LPL has been associated with various disease, such as atherosclerosis, obesity, or diabetes (43). Several polymorphisms disrupt normal LPL function and contribute to the premature development of CHD (44). T495G *Hind*III polymorphism has been associated with the higher plasma TG and lower HDL levels characteristic for diabetes and obesity (3). These alterations were attenuated by environmental factors as physical exercise and low calorie diets (45).

Obesity

The contributions of genetic and socioeconomic factors in obesity, and the mechanisms by which these interact in human societies, are incompletelly known (46). During evolution, several genes have been selected to favor fat accumulation. Now, in presence of an increased food availability and decreased physical activity, and these genes confer a susceptibility to obesity (47).

There are more than 600 genes, markers and chromosomal regions associated with human obesity (48). The rare monogenic forms of obesity imply at least 10 different genes, but have a limited relevance for study of disease (46). The genetic susceptibility to obesity is polygenic. At least, fifty nine chromosomal loci, distributed over all chromosomes except Y, have been linked to obesity and more than two hundred genes have been associated with obesity (49). The relative risk between a specific gene allele and obesity remains low because each gene probably contributes only for a small part and it is thus important to consider the association of polymorphisms on different genes (50).

An pathogenic mechanism in obesity implies the leptin pathway. Leptin (a cytokine-like polypeptide) informs the brain about fat storage level and controls food intake through the activation of hypothalamic leptin receptors. Leptin induces the synthesis of α-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH) inhibiting the effectors of food intake. Mutations in genes of leptin, leptin's receptor or enzyme implied in formation of α-MSH produce all morbid obesity with onset in the first months of life, associated with endocrine abnormalities (51).

The effects of genetic polymorphisms associated with sporadic obesity at the population level are harder to study. Each polymorphism modulate the risk of developing obesity by few percent, but the interactions between genotypes for obesity-linked genes may be important (46). DNA microarrays can demonstrate tissue-specific alterations in expression of genes involved in adipogenesis, inflammation and gluconeogenesis, formation of fat depots, effects of weight loss/caloric restriction patterns of gene expression in adipose tissue and differential responses to nutritional stimuli in obese vs. lean individuals (51,52,53). It is evident that more comprehensive and focused studies will be useful to obtain an overview for the changes in gene expression related to obesity (46).

Diabetus mellitus

Type 2 diabetes mellitus (DM) is a chronic disease produces by genotype-diet interactions that occur in sedentary, obese individuals and certain minority groups (54,55). The importance of lifestyle in DM is demonstrated by a higher rate of incidence in individuals with inactive lives and/or with high levels of food consumption. Susceptibility genes, involved in regulating lipid metabolism and insulin sensitivity,

modulate the risk of disease onset (12).

Food components modulate gene expression acting as ligands of transcription factors, being metabolized or affecting signal pathways and energy balance (3,5). PUFA regulate the cellular machinery in a variety of healthy and carcinomic tissues. PUFA are ligands for some nuclear receptors, that are nutrient-sensitive and act as sensors for dietary fatty acids. Microarrays works showed that PUFA mediate the functions of several transcription factors, cell-cycle regulatory genes, RNA transcription processes, prostaglandin synthesis, and inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes (56,57). Genes involved in fatty acid metabolism are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor family (PPARα, PPARγ and PPARδ) or the sterol regulatory element binding protein (SREBP) (5). PUFA alterate lipid metabolism and remodelates several lipid species, such as phospholipids (PLs), TGs, and cholesterol esters (CEs) (58,59). The consumption of PUFA influence positivelly growth, neurological development, lean and fat mass accretion, reproduction, innate and acquired immunity, progression of chronic and degenerative diseases including cancer, atherosclerosis, stroke, arthritis, diabetes, osteoporosis etc. (3).

PPARs are an important group of ligand-activated transcription factors that mediate the cellular response to synthetic and biological compounds, such as fibrates, thiazolidinediones, and fatty acids (60,61). Fatty acids (palmitic, oleic, linoleic, arachidonic) and eicosanoids are ligands for PPARs, meaning that these nuclear receptors are lipid sensors. Pro12Ala polymorphism in the PPAR-γ2 gene influences body mass index, affecting insulin resistance and the risk of myocardial infarction in DM. Thus, individuals with the Ala allele have a greater BMI than individuals with the Pro allele (62,63).

The membrane-bound transcription factors SREBP-1a/1c have an important role in fatty acid synthesis, activating directly the expression of more than 30 genes involved in the synthesis and uptake of cholesterol, fatty acids, TGs, and PLs (64). SREBPs are activated when low levels of oxysterol and changes in insulin/glucose and polyunsaturated fatty acids occur. Two missense mutations (P87L and P416A) in exons coding the aminoterminal transcriptional activating domain of SREBP-1c was identified at individuals displaying severe insulin resistance. Another concludent association between DM and SREBP-1c is the presence of intronic SNP (C/T) between exons 18c and 19c in genome of men with diabetes, but not in women (5).

The structure and function of gut influence the glucidic and lipidic metabolism. The presence of a gut microbiota mediates energy storage by increasing fat reserves and insulin resistance, and thus influence the development of DM and obesity (65). Fibers increased the viscosity of the gastrointestinal contents which decrease plasma cholesterol levels. The intestinal fatty acid binding protein (IFABP) bind and transport long-chain fatty acids (LCFA) in the cytoplasm of columnar absorptive epithelial cells of the small intestine (67). The IFABP gene has the Ala54Thr polymorphism. The Thr54 allele is associated with a high affinity to bind LCFA, increase TG secretion, impaired insulin action and increased fat oxidation in several populations (68).

Cancer

The cancer results from the interaction between genetic and environmental factors (2). Between environmental factors, the diet is most important, especially in colon, breast, and prostate cancer. The complexity of dietary patterns in combination with the biochemical diversity of foods generates great difficulties to identify protective and cancer risk-enhancing factors in diets (68).

Foods are complex mixtures of molecules that likely modulate a host of genetic pathways. It exists evidences that optimising intakes of micronutrients could have an important impact on public health by helping prevent cancer and other chronic diseases (69). Much of these evidences suggest that the greatest protection coincides with greater fruit, vegetable, and grain consumption (70).

Our diet contains at least 25,000 different chemical compounds present in fruits, vegetables, and other plants. They can encompass such diverse chemical classes as carotenoids, flavonoids, organosulfur compounds, isothiocyanates, indoles, monoterpenes, phenolic acids, and chlorophyll. Most of these nutrients can influence gene expression in normal or malignant cells (7,8,9,10,71). Also, zoochemicals, like conjugated linoleic acid and *n*-3 fatty acids from animal products can modify cancer (72). In addition, compounds of mushrooms (fungochemicals) have anticancer properties. The microorganisms from gastrointestinal tract form compounds (bacteriochemicals) that may increase or decrease cancer (68,73).

Gene-nutrient interactions influence all stages of carcinogenesis: preventing the initial mutation, blocking promotion to premalignant tumors, stopping progression to in situ carcinomas or preventing metastasis (19). For example, *n*-3 polyunsaturated fatty acids and flavonoids may suppress tumour development. Lycopene can be protective in prostate cancer and the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate is associated with reduction in cancer risk and rate of ageing in animals and humans (74,75).

Hyperphosphorylation of some proteins produces the antiproliferative properties of garlic and its allyl sulfur components. It is likely that other food components may also operate by influencing phosphorylation, thiolation, or glycosylation or shifting other posttranslational regulatory events (1).

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is a key gene in one-carbon metabolism. The C667T polymorphism reduces enzymatic activity and is inversely associated with colorectal cancer (76,77,78) and acute lymphocyte leukemia (79). Reduced activity of MTHFR in T carriers may increase the methylation of dUMP to dTMP, resulting in less incorporation of uracil into DNA, fewer DNA breaks, and a decreased risk for cancer. This gene-diet interaction was specially found for colorectal adenomas. Colon cancer risk was reduced 30% to 40% in TT individuals who consumed adequate dietary intakes of folate, vitamin B12, and vitamin B6 (19).

N-acetyltransferase has two isoforms (NAT1 and NAT2) and it is involved in the acetylation of aromatic and heterocyclic amine carcinogens, presented in cooked proteins. Subjects carrying the rapid NAT2 acetylator allele have a higher risk of colon cancer when consuming larger amounts of meat. This reflects the greater ability of rapid acetylators to activate heterocyclic aromatic amines to carcinogenic derivatives within the colon mucosa (19).

Glutatione-S-transferases (GSTs), classified in four groups (GSTA, GSTP, GSTM, and GSTT) detoxify reactive electrophiles, characteristics for toxins and carcinogens. GSTM1- and GSTT1- null genotypes confer a high risk of several types of cancer, particularly among subgroups exposed to tobacco smoking or to other sources of carcinogens. At these individuals, the intake of cruciferous vegetables has a protective effect, but this depends on the content of bioactive compounds and the methods used to prepare these foods (19,80).

Ala9Val polymorphisms of manganese superoxide dismutase (MnSOD) disables transport of enzyme to the mitochondrion, increasing susceptibility to oxidative stress and breast cancer risk. Individuals with this MnSOD mutation appear to benefit from a higher intake of fruits and vegetables and/

or vitamin C in terms of protection against breast cancer (81).

OUTLOOK

The etiologic roles of dietary factors in human diseases are difficult to measure, and for these reasons are necessary to use the specific tools of genomic era, before to making specific dietary recommendations (82). The microarrays technologies enhance the ability to explore genetic changes associated with cancer etiology and discover new biomarkers for diagnosis and prognosis prediction and new nutrition preemption strategies. The nutrigenomic effects of bioactive food components result in marked increases or suppression in the expression of multiple genes (1).

REFERENCES

1. Milner JA. Incorporating basic nutrition science into health interventions for cancer prevention. *J Nutr* 2003; 133: 3820S-3826S.
2. Go VLW, Nguyen CTH, Harris DM et al. Nutrient-gene interaction: metabolic genotype-phenotype relationship. *J Nutr* 2005; 135: 3016S-3020S.
3. Mutch DM, Wahli W, Williamson G. Nutrigenomics and nutrigenetics: the emerging faces of nutrition. *FASEB J* 2005; 19: 1602-1616.
4. Seedorf U, Schulte H, Assmann G. Genes, diet and public health. *Genes Nutr* 2007; 2: 75-80.
5. Izar MCO. Nutrigenomics and nutrigenetics. Future perspectives for disease prevention. *Int J Atheroscler* 2007; 2: 203-206.
6. Joost HG. Prevention of complex diseases by genotype-based nutrition: realistic concept or fiction? *J Mol Med* 2007; 85: 103-105.
7. Gorduza VM, Munteanu M. *Antioxidanţi biomimetici*. Iaşi: Ed. Tehnopress, 2005.
8. Gorduza VM, Munteanu M, Gorduza EV. Antioxidant chromogeneous systems. *Proc of the 30th Annual Congr. of American-Romanian Academy*. Central Publishing House Chişinau, 2005, 248-252.
9. Gorduza VM, Simionescu CI, Munteanu M, Gorduza EV. Antioxidant compounds and biomarkers. *Memoriile Secţiilor Ştiinţifice Academia Română* 2004; IV, tom XXVII: 33-67.
10. Gorduza VM, Tărăbaşanu-Mihăilă C, Gorduza EV, Cernătescu C. Structure reactivity relationships of antiooxidant flavonoids. *Ovidius University Ann Chem* 2000; 11: 56-59.
11. Fairfield KM, Fletcher RH. Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA* 2002; 287: 3116-3126.
12. Kaput J, Rodriguez RL. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 2004; 16: 166-177.
13. Clarke SD. Nutrient regulation of gene and protein expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1999; 2: 287-289.
14. Dauncey MJ, White P, Burton KA, Katsumata M. Nutrition hormone receptor-gene interactions: implications for development and disease. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 63-72.
15. Mooser V, Ordovas JM. „Omic" approaches and lipid metabolism: are these new technologies holding their promises? *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 115-119.
16. Cahill DJ, Nordhoff E. Protein arrays and their role in proteomics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003; 83: 177-187.
17. Rose K, Bougueleret L, Baussant T et al. Industrial-scale proteomics: from liters of plasma to chemically synthesized proteins. *Proteomics* 2004; 4: 2125-2150.
18. Corthésy-Theulaz I, denDunnen JT, Ferré P et al. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab* 2005; 49: 355-365.
19. Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004; 5: 71-118.
20. Jimenez-Sanches G, Childs B, Valle D. Human disease genes. *Nature* 2001; 409: 853-855.

21. Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 2002 ; 4 : 45-61.
22. Cederbaum S. Phenylketonuria : an update. *Curr Opin Pediatr* 2002 ; 14 : 702-706.
23. Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency : classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. *Am J Hum Genet* 1998 ; 63 : 71-79.
24. Pey AL, Desviat LR, Gamez A, Ugarte M, Perez B. Phenylketonuria : genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum Mutat* 2003 ; 21 : 370-378.
25. Walter JH, Collins JE, Leonard JV. Recommendations for the management of galactosaemia. UK Galactosaemia Steering Group. *Dis Child* 1999 ; 80 : 93-96.
26. Tyfield LA. Galactosaemia and allelic variation at the galactose-1-phosphate uridyltransferase gene : a complex relationship between genotype and phenotype. *Eur J Pediatr* 2000 ; 159 : 204-207.
27. Hollox EJ, Poulter M, Zvarik M, Ferak V, Krause A. Lactase haplotype diversity in the Old World. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 160-172.
28. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L. Identification of a variant associated with adulttype hypolactasia. *Nat Genet* 2002 ; 30 : 233-237.
29. Dewar D, Pereira SP, Ciclitira PJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 ; 36 : 17-24.
30. Sollid L. Coeliac disease : dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002 ; 9 : 647-655.
31. Bhatnagar D, Morgan J, Siddiq S, Mackness MI, Miller JP. Outcome of case finding among relatives of patients with known heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Br Med J* 2000 ; 321 : 1497-1500.
32. Sijbrands EJ, Westendorp RG, Defesche JC et al. Mortality over two centuries in large pedigree with familial hypercholesterolaemia : family tree mortality study. *Br Med J* 2001 ; 322 : 1019-1023.
33. Williams RR, Hasstedt SJ, Wilson DE, Ash KO, Yanowitz FF. Evidence that men with familial hypercholesterolemia can avoid early coronary death. An analysis of 77 gene carriers in four Utah pedigrees. *JAMA* 1986 ; 255 : 219-224.
34. Gillies PJ, Krul ES. Using genetic variation to optimize nutritional preemption. *J Nutr* 2007 ; 137 : 270S-274S.
35. Corella D, Ordovas JM. Single nucleotide polymorphisms that influence lipid metabolism : interaction with dietary factors. *Annu Rev Nutr* 2005 ; 25 : 341-390.
36. Lehtinen S, Luoma P, Nayha S, Hassi J, Ehnholm C. Apolipoprotein A-IV polymorphism in Saami and Finns : frequency and effect on serum lipid levels. *Ann Med* 1998 ; 30 : 218-223.
37. Pepe G, Di Perna V, Resta F, Lovecchio M, Chimienti G. In search of a biological pattern for human longevity : impact of apo A-IV genetic polymorphisms on lipoproteins and the hyper-Lp(a) in centarians. *Atherosclerosis* 1998 ; 137 : 407-417.
38. Von Eckardstein A, Funke H, Schulte M, Erren M, Schulte H. Nonsynonymous polymorphic sites in the apolipoprotein (apo) A-IV gene are associated with changes in the concentration of apo B- and apo A-I-containing lipoproteins in a normal population. *Am J Hum Genet* 1992 ; 50 : 1115-1128.
39. Weinberg RB, Geissinger BW, Kasala K, Hockey KJ, Terry JG. The effect of apolipoprotein A-IV genotype and dietary fat on cholesterol absorption. *J Lipid Res* 2000 ; 41 : 2035-2041.
40. Wallace AJ, Humphries SB, Fisher RM, Mann JI, Chisholm A. Genetic factors associated with response of LDL subfractions to change in the nature of dietary fat. *Atherosclerosis* 2000 ; 149 : 387-394.
41. Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2000 ; 11 : 105-115.
42. Ordovas JM, Corella D, Cupples LA et al. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the APOA1 G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner : the Framingham Study. *Am J Clin Nutr* 2002 ; 75 : 38-46.

43. Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase : structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 2002 ; 80 : 753-769.
44. Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase : genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res* 2002 ; 43 : 1997-2006.
45. Senti M, Elosua R, Tomas M et al. Physical activity modulates the combined effect of a common variant of the lipoprotein lipase gene and smoking on serum triglyceride levels and high-density lipoprotein cholesterol in men. *Hum Genet* 2001 ; 109 : 385-392.
46. Elliott RM, Johnson IT. Nutrigenomic approaches for obesity research. *Obesity Rev* 2007 ; 8 (suppl. 1) : 77-81.
47. Backhed F, Ding H, Wang T et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 15718-15723.
48. Kaput J, Ordovas JM, Ferguson L et al. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr* 2005 ; 94 : 623-632.
49. Rankinen T, Perusse L, Weisnagel SJ et al. The human obesity gene map : the 2001 update. *Obes Res* 2002 ; 10 : 196-243.
50. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of body-weight regulation. *Nature* 2000 ; 404 : 644-651.
51. Nadler ST, Attie AD. Please pass the chips : genomic insights into obesity and diabetes. *J Nutr* 2001 ; 131 : 2078-2081.
52. Lan H, Rabaglia ME, Stoehr JP et al. Gene expression profiles of nondiabetic and diabetic obese mice suggest a role of hepatic lipogenic capacity in diabetes susceptibility. *Diabetes* 2003 ; 52 : 688-700.
53. Permana PA, Del Parigi A, Tataranni PA. Microarray gene expression profiling in obesity and insulin resistance. *Nutrition* 2004 ; 20 : 134-138.
54. Black SA. Diabetes, diversity, and disparity : what do we do with the evidence ? *Am J Public Health* 2002 ; 92 : 543-548.
55. Boden G. Pathogenesis of type 2 diabetes. Insulin resistance. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2001 ; 30 : 801-815.
56. Reyes N, Reyes I, Tiwari R, Geliebter J. Effect of linoleic acid on proliferation and gene expression in the breast cancer cell line T47D. *Cancer Lett* 2004 ; 209 : 25-35.
57. Narayanan BA, Narayanan NK, Simi B, Reddy BS. Modulation of inducible nitric oxide synthase and related proinflammatory genes by the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 972-979.
58. Bellenger J, Bellenger S, Clement L et al. A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl CoA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J* 2004 ; 18 : 773-775.
59. Kramer JA, LeDeaux J, Butteiger D et al. Transcription profiling in rat liver in response to dietary docosahexaenoic acid implicates stearoyl-coenzyme a desaturase as a nutritional target for lipid lowering. *J Nutr* 2003 ; 133 : 57-66.
60. Go VL, Butrum RR, Wong DA. Diet, nutrition, and cancer prevention : the postgenomic era. *J Nutr* 2003 ; 133 : 3830S-3836S.
61. Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs : transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci* 2002 ; 59 : 790-798.
62. Swarbrick MM, Chapman CM, McQuillan BM et al. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinol* 2001 ; 144 : 277-282.
63. Valve R, Sivenius K, Miettinen R et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 ; 84 : 3708-3712.
64. Horton JD, Shah NA, Warrington JA. et al Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 12027-12032.

65. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs : activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1125-1131.
66. Darimont C, Gradoux N, Persohn E, Cumin F, De Pover A. Effects of intestinal fatty acid-binding protein overexpression on fatty acid metabolism in Caco-2 cells. *J Lipid Res* 2000 ; 41 : 84-92.
67. Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC et al. An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding protein is associated with increased fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995 ; 95 : 1281-1287.
68. Mathers JC. Nutrition and cancer prevention : diet-gene interactions. *Proc Nutr Soc* 2003 ; 62 : 605-610.
69. Ames BN, Wakimoto P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk ? *Nat Rev Canc* 2002 ; 2 : 694-704.
70. Milner JA, McDonald SS, Anderson DE. Molecular targets for nutrients involved with cancer prevention. *Nutr Cancer* 2001, 41, 1-16.
71. Davis CD, Milner J. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutat Res* 2004 ; 13 : 51-64.
72. Belury MA. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid : potential mechanisms of action. *J Nutr* 2001 : 232 : 2995-2998.
73. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003, 361, 512-519.
74. Giovannucci EA. Review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Exp Biol Med* 2002 ; 227 : 852-859.
75. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA. Managanese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants and risk of breast cancer. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 602-606.
76. Chen J, Giovannucci EL, Hunter DJ. MTHFR polymorphism, methyl-replete diets and the risk of colorectal carcinoma and adenoma among US men and women : an example of gene-environment interactions in colorectal tumorigenesis. *J Nutr* 1999 ; 129 : 560S-564S.
77. Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. Methylenetetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 ; 8 : 513-518.
78. Ulrich CM, Kampman E, Bigler J et al. Colorectal adenomas and the C677T MTHFR polymorphism : evidence for gene-environment interaction ? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 ; 8 : 659-668.
79. Skibola CF, Smith MT, Kane E et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 : 12810-12815.
80. Rock CL, Lampe JW, Patterson RE. Nutrition, genetics, and risks of cancer. *Annu Rev Public Health* 2000 ; 21 : 47-64.
81. Vineis P. Diet, genetic susceptibility and carcinogenesis. *Public Health Nutr* 2001 ; 4 : 485-491.
82. Fenech M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts : diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis* 2005 ; 20 : 255-269.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

ŞTIINŢE FUNDAMENTALE — ARTICOLE ORIGINALE

MODIFICĂRI STRUCTURALE DE MICROMEDIU TUMORAL ÎN METASTAZELE HEPATICE ALE CARCINOMULUI COLORECTAL

Simona Eliza Giuşcă[1], E. Carasevici[2], Fl. Eloae-Zugun[2], E. Târcoveanu[1], Irina Draga Căruntu[3]
Spitalul Clinic Judeţean de Urgenţă Universitar "Sf. Spiridon" Iaşi
1 Clinica Chirurgie I
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
2 Disciplina de Imunologie
Facultatea de Medicină Dentară
3 Disciplina de Histologie

STRUCTURAL CHANGES OF TUMOR MICROENVIRONMENT IN LIVER METASTASES OF COLORECTAL CARCINOMA (Abstract) : The immunohistochemistry represents a very effective tool for describing the biological phenomena that characterize the primary or secondary neoplastic development. By using a complex immuno-morphologic approach, our study aims to develop a characterization of the metastatic liver microenvironment, based on the following features : similarities and differences in the proliferation activity, particular aspects of vascularity and immune response, the cellular dialogue generated at the level of the parenchyma - neoplastic tissue interface, the structure of the associated stroma. **Material and methods** : Ten cases of liver metastases have been studied, including five treated exclusively by surgery (group 1) and five with recurrent metastases occurred after a previous treatment by thermonecrosis (group 2). The cases were investigated by routine histopathological exam and by immunohistochemistry. The choice of the antibodies was motivated by the follow-up of the parameter classes presented below : (i) proliferation/apoptosis ; (ii) structure ; (iii) angiogenesis and lymphangiogenesis ; (iv) immunological reactivity ; (v) cytokines. **Results** : The elements defining the histopathologic and immunohistochemical patterns allowed a comparative evaluation of the metastasis models considered for the two groups of studied cases. The analysis of proliferation / apoptosis parameters proved a high aggressiveness in tumor proliferation for both types of metastases. Recurrent metastases showed an increased angiogenesis and a moderate lymphangiogenesis, as well as a massive matrix reshaping. The evaluation of the inflammatory infiltrate suggested that the development of the liver metastases is not accompanied by significant immunologic rejection, but it rather induces the tissue remodeling at the invasion border level. The recurrence corresponds to a typical interval of 6 months or longer, and is associated with intense fibrogenesis, angiogenesis, and inconsistent inflammatory infiltrate. **Conclusions** : Therefore, the efficiency of the thermonecrosis procedure with water vapors seems to drastically depend on the complete necrosis of the target tumor, plus the adjacent cells of the parenchyma in a neighborhood of some millimeters. Moreover, the therapy must include anti-angiogenic resources as well as inflammation modulators, since the vascular supply and the leukocytic activity support the metastasis development. **Key words** : HEPATIC METASTASES, COLORECTAL CARCINOMA, MICROENVIRONMENT, IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Neoplasmul hepatic secundar reprezintă un grup de afecţiuni cu prognostic nefavorabil, greu de diagnosticat în stadii incipiente şi dificil de tratat curativ. Prin frecvenţa în creştere, cancerul colorectal domină spectrul cauzelor de cancer hepatic

secundar, fiind urmat de cancerul pancreatic, gastric, ovarian şi pulmonal. Speranţa de viaţă în afara tratamentului este, pentru cei mai mulţi dintre pacienţi, de doar 6-10 luni, în condiţiile în care răspunsul la regimurile chimioterapice nespecifice standard este adesea modest (1,2).

Studii clinice realizate în ultima decadă au clarificat criteriile de indicaţie şi de eficienţă ale metodelor convenţionale şi au consolidat unele noi abordări terapeutice. Rezecţia rămâne în continuare tratamentul curativ ideal, dar ea poate fi indicată numai la 20% dintre cazuri, 80% dintre cazuri beneficiind doar de alternative terapeutice cu eficienţă scăzută – de exemplu chimioterapia (3). Supravieţuirea pare a fi dependentă de invazia microscopică peste marginea de rezecţie (4,5). Pentru chirurgia paliativă a metastazelor hepatice, două alternative au fost mai clar definite: termonecroza criotermică (crioablaţia) şi termonecroza hipertermică (prin laser (6), radiofrecvenţă, ultrasunete focalizate, microunde (7), vapori de apă (8)). Ca rezultat al extinderii utilizării acestor metode în centre clinice înalt specializate, s-au constituit norme de aplicabilitate (9) capabile să asigure remisiuni (10), să întârzie reluarea de evoluţie, să permită reintervenţii multiple în cazul recidivelor (11) şi, eventual, să atingă nivel curativ.

O direcţie de cercetare prioritară vizează baza biologică de dezvoltare a metastazelor hepatice, urmărindu-se o mai bună înţelegere a determinanţilor de eficienţă a terapiilor în uz sau a justificării unor metode terapeutice novatoare, obiectivul final fiind creşterea ratei de supravieţuire şi ameliorarea calităţii vieţii pacienţilor. Ficatul este considerat un organ imunologic particular (12), diseminarea la acest nivel având un potenţial tolerant prin acţiunea unei palete largi de factori, între care recent descrisă este abilitatea de a favoriza dezvoltarea limfocitelor T reglatorii (13). În caracterizarea procesului de oncogeneză metastatică hepatică, eforturile de cercetare fundamentală sunt concentrate cu prioritate asupra interacţiunii ţesut malign - micromediu stromal (14), în principal prin prisma relaţiei imunologice stabilite între tumora primară metastazată şi parenchimul hepatic (15). În acest context, eficienţa sistemelor terapeutice depinde de gradul în care identifică, includ şi controlează ţintele relevante ale acestei interacţiuni. Potenţialele ţinte terapeutice, celulare şi moleculare, sunt evaluate în baza unor procese biologice complexe, în cadrul cărora sunt incluse angiogeneza, proliferarea celulară, controlul suicidului celular, reactivitatea imunologică.

Puterea analitică a tehnicilor moderne, cu rol în generarea datelor de predicţie, oferă oportunităţi generoase pentru înţelegerea consistenţei funcţionalităţii factorilor celulari, moleculari şi genici implicaţi în interacţiunile complexe ale progresiei neoplazice (16). Natura redundantă a multora dintre factori, instabilitatea genomică asociind diversificare clonală intratumorală şi la nivelul situsurilor de metastazare (17), alături de heterogenitatea în raport cu tipul histologic originar (18) constituie elemente de interes major asupra cărora se concentrează eforturile cercetătorilor.

Pornind de la experienţa Clinicii Chirurgie I în tratamentul chirurgical al metastazelor hepatice, inclusiv prin termonecroză cu vapori de apă, cercetarea imunomorfologică realizată a urmărit caracterizarea fenomenelor biologice care guvernează invazivitatea tumorală în procesul de dezvoltare a metastazelor hepatice, prin intermediul unor markeri celulari şi moleculari.

MATERIAL ŞI METODĂ

Metodologia de lucru a inclus, ca primă etapă, intervenţia chirurgicală - obligatorie pentru diagnostic, includere în lot, recoltare de material biologic.

Au fost analizate metastaze hepatice se-

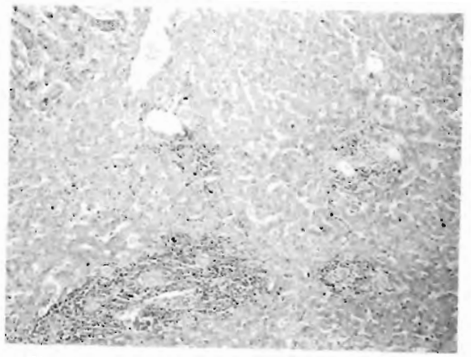


Fig. 1. Infiltrat inflamator limfocitar, dispus difuz printre hepatocite şi/sau organizat în spaţiile porto-biliare, moderat reprezentat la distanţă de proliferarea neoplazică şi evident în apropierea acesteia (HE x10)

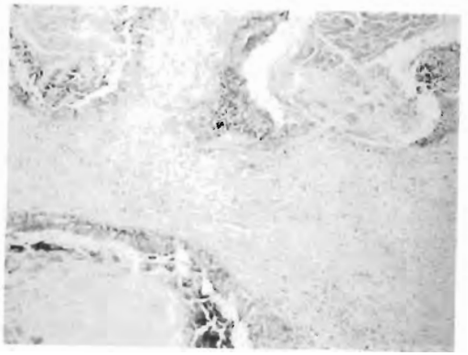


Fig. 2. Trabecule conjunctive largi, posibil ţesut cicatricial cu rol de reparare a ariilor distruse prin termonecroză (HE x10)

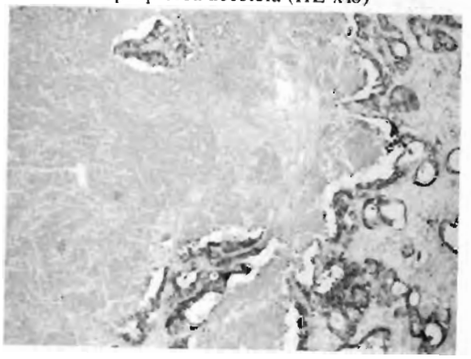


Fig. 3. Necroză tumorală extinsă, înglobând glande cu aspect cribriform (HE x10)

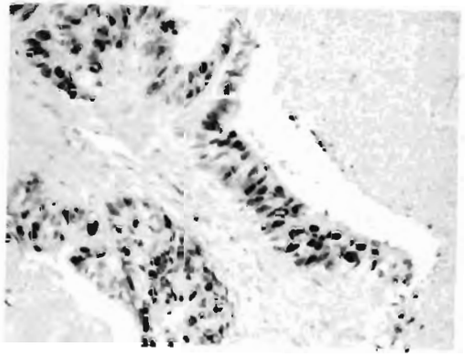


Fig. 4. Reacţie pozitivă pentru topoizomeraza α2 la nivelul glandelor tumorale, index 90% (IHC Ac. anti-topoizomerază α2 x20)

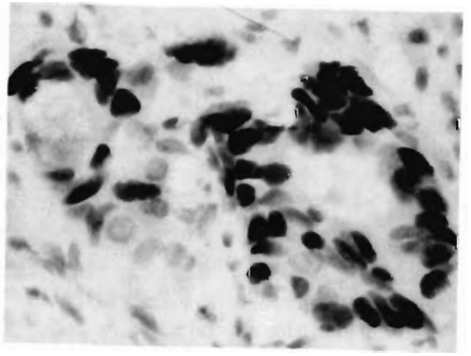


Fig. 5. Reacţie pozitivă pentru p53, index 95%, detaliu pentru o glandă tumorală (IHC Ac. anti-p53 x40)

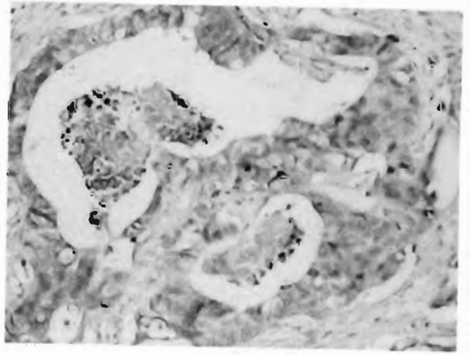


Fig. 6. Reacţie pozitivă pentru Bax în epiteliul tumoral, negativă în masa de necroză (IHC Ac. anti-Bax x20)

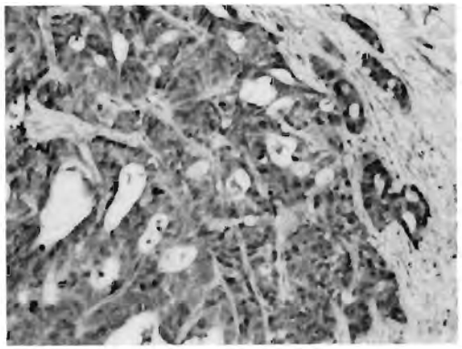


Fig. 7. Reacţie pozitivă pentru bcl-2 la nivelul glandelor tumorale (IHC Ac. anti-bcl-2 x20)

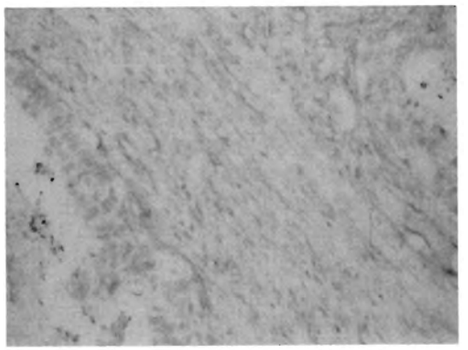


Fig. 8. Reacţie pozitivă pentru colagenul IV (IHC Ac. anti-colagen IV x20)

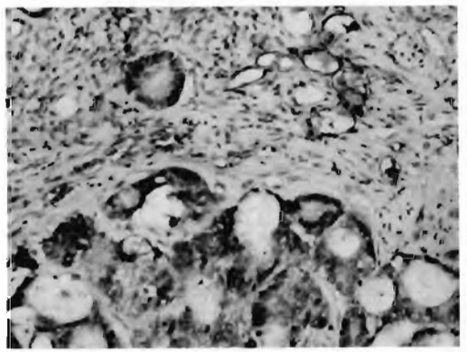


Fig. 9. Reacţie pozitivă pentru CD31, vase localizate peritumoral (IHC Ac. anti-CD31 x20)

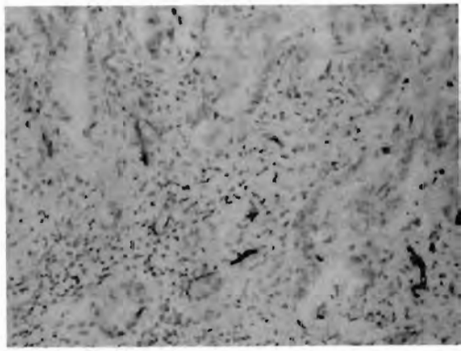


Fig. 10. Reacţie pozitivă pentru D2_40, rare elemente vasculare de tip limfatic (IHC Ac. anti-D2_40 x20)

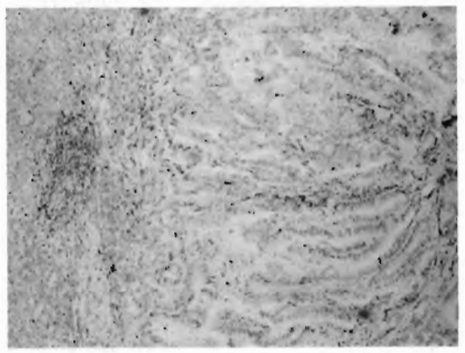


Fig. 11. Reacţie pozitivă pentru CD3, evidenţiind limfocitele T prezente la interfaţa parenchim - tumoră (IHC Ac. anti-CD3 x10)

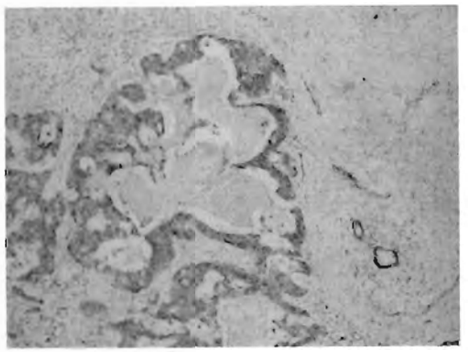


Fig. 12. Reacţie pozitivă pentru VEGF-A la nivelul glandelor tumorale (IHC Ac. anti-VEGF-A x20)

cundare cancerului colorectal, rezecate chirurgical ab initio (fără termonecroz") - lotul I (5 cazuri) şi metastaze hepatice secundare cancerului colo-rectal, tratate anterior prin termonecroză, cu dezvoltare de noi metastaze hepatice (recidivă/reluare de evoluţie)- lotul II (5 cazuri).

Cazurile selectate au fost supuse unei investigaţii morfologice complexe, în microscopie optică convenţională (examen histopatologic standard) şi imunohistochimie.

Examenul imunohistochimic a fost realizat utilizând un panel larg de anticorpi, alegerea acestora fiind motivată prin urmărirea următoarelor clase de parametri: (1) parametri de proliferare/apoptoză (topoizomerază α2, p53, Bax, bcl-2); (2) parametri structurali (colagen IV); (3) parametri pentru angiogeneză şi limfangiogeneză (CD31, D2-40); (4) parametri pentru reactivitate imunologică (CD3, CD68); (5) parametri citokinici (VEGF-A, VEGFR2). În tehnica imunohistochimică, bazată pe principiul reacţiei streptavidin-biotin, au fost optimizate protocoale de lucru pentru fiecare anticorp.

Indexul de pozitivitate topoizomerază α2 (indexul topo-α2), indexul p53 şi indexul Bax s-au calculat ca număr de celule pozitive raportat la 100 celule pozitive şi negative, pe câmpuri microscopice analizate cu obiectiv x 40 (18,19). Expresia bcl-2 a fost evaluată în funcţie de procentajul de celule tumorale cu reacţie pozitivă citoplasmatică, reacţia fiind considerată negativă dacă procentul de celule de celule pozitivate a fost sub 5% şi pozitivă - peste 5% (19). Similar a fost evaluată expresia VEGF-A şi VEGFR2. Pentru cuantificarea microdensităţii vasculare am ales 5 câmpuri vasculare cu densitatea cea mai mare, la obiectiv x40, calculându-se valoarea medie a numărului de vase pozitive pe câmp (20). Prezenţa colagenului, a limfocitelor T şi a macrofagelor a fost apreciată semicantitativ ca prezentă, respectiv absentă.

REZULTATE

În evaluarea tabloului histopatologic al metastazelor hepatice, în coloraţiile de rutină, s-au remarcat o serie de elemente morfologice particulare. Ca o trăsatură definitorie a metastazelor hepatice rezecate chirurgical, menţionăm apariţia unui infiltrat inflamator de tip cronic cu o excelentă reprezentare la limita tumoră - parenchim hepatic (fig. 1) şi compresia hepatocitelor adiacente proliferării neoplazice, cu pattern glandular bine diferenţiat, moderat diferenţiat sau slab diferenţiat. Glandele au avut dimensiuni diferite şi, uneori, au prezentat necroză tumorală intraluminală. În situaţia practicării termonecrozei, tabloul histologic al recidivelor a fost caracterizat prin trabecule conjunctive largi, în esenţă ţesut cicatricial de reparare a ariilor distruse prin termonecroză (fig. 2), alături de persistenţa unor arii de necroză tumorală extinsă, în lumenul unor structuri glandulare nou formate sau înglobând resturi glandulare (fig. 3).

Studiul markerilor moleculari prin intermediul cărora am urmărit aprofundarea procesului de carcinogeneza a relevat:

- valori diferite ale indexului pentru topoizomeraza α2, mai mici pentru metastazele hepatice rezecate chirurgical (valoare medie 70%), comparativ cu recidivele tumorale post-termonecroză (valoare medie 90%) (fig. 4);
- valori diferite ale indexului pentru p53, mai mici pentru metastazele hepatice rezecate chirurgical (valoare medie 60%), comparativ cu recidivele tumorale post-termonecroză (valoare medie 90%) (fig. 5);
- reacţie Bax pozitivă în celulele tumorale, cu un indice de peste 90% (fig. 6), atât în metastazele rezecate, cât şi în recidivele post-termonecroză, şi reacţie Bax negativă în ariile de necroză;
- reacţie bcl-2 pozitivă pentru metastazele hepatice rezecate chirurgical (fig. 7);
- reacţie pozitivă pentru colagenul IV în zonele de stromă desmoplazică din recidivele tumorale post-termonecroză (fig. 8);
- microdensitate vasculară crescută, evidenţiată prin reacţiile CD31 pozitive, în principal la graniţa tumoră - parenchim

hepatic normal, în cazul metastazelor rezecate chirurgical, dar şi peri/intratumoral, în cazul recidivelor tumorale post-termonecroză (fig. 9)

- microdensitate limfatică scazută, evidenţiabilă la interfaţa tumoră - parenchim hepatic normal (pentru metastazele rezecate chirurgical), precum şi în stroma desmoplazică dezvoltată în recidivele tumorale post-termonecroză (fig. 10)
- reacţie pozitivă pentru limfocitele T la limita tumoră - parenchim hepatic normal, în metastazele rezecate chirurgical, sugerând un răspuns imun important (fig. 11)
- reacţie pozitivă pentru VEGF-A (fig. 12) şi VEGFR2, în special la nivelul frontului de invazie în recidivele post-termonecroză, susţinând răspunsul pozitiv la terapia cu BEVACIZUMAB.

DISCUŢII

Analiza aprofundată a studiilor dedicate metastazelor hepatice secundare cancerului colorectal publicate în ultimii ani, relevă câteva direcţii prioritare: (1) activitatea proliferativă şi apoptotică, perturbarea echilibrului dintre factorii pro şi anti-apoptotici guvernând progresia tumorală (22, 23,24); (2) angiogeneza şi limfangiogeneza - cruciale în extensia la distanţă a tumorii şi în invazia locală, coordonate prin intermediul factorilor vasculoactivi (de tipul moleculelor VEGF şi a receptorilor corespunzători) (24,25,26); (3) infiltratul inflamator asociat, în principal modul în care celulele tumorale evită sau nu răspunsul imun al limfocitelor T, NK (27,28,29,30) şi al macrofagelor (30,31); remodelarea matricei conjunctive - până la procesul de fibroză reparativă, proces extrem de dinamic prin intervenţia colagenului şi lamininei (32), metaloproteinazelor si inhibitorilor de proteinaze (33,34). Ca tendinţă generală, cercetările sunt axate asupra unei singure direcţii şi de multe ori rezultatele sunt contradictorii. Consecutiv, în lipsa corelării şi interpretării mai multor tipuri de informaţii referitoare la statusul biologic al metastazelor, tabloul procesului de metastazare hepatică nu este complet conturat.

În aceste condiţii, prin abordarea imunomorfologică complexă, studiul nostru vizează o caracterizare a micromediului hepatic metastatic, fundamentată pe similitudinile, respectiv diferenţele în activitatea proliferativă, particularităţile de vascularizaţie şi răspuns imun, dialogul celular la interfaţa parenchim hepatic - proliferare neoplazică, modul de organizare a stromei aasociate. Mai mult, evaluarea noastră se bazează pe investigarea procesului de metastazare primară versus recidiva post-termonecroză.

În mod concret, analiza parametrilor de proliferare/apoptoză a indicat o agresivitate crescută a proliferării tumorale în ambele tipuri de metastaze, valorile indexilor utilizaţi situându-se peste valorile raportate în literatură pentru carcinomul colorectal. Am remarcat, în cazul recidivelor, angiogeneză crescută asociată cu limfangiogeneză scăzută, precum şi remodelare matriceală masivă. Evaluarea infiltratului inflamator a sugerat faptul ca metastazele hepatice se dezvolta fara a induce fenomene evidente de rejet imunologic. În cazul recidivelor, elementele imuno-morfologice indică instalarea unui proces de remodelare la nivelul frontului de invazie, reluarea de evolutie intr-un interval mediu de peste 6 luni pentru cazurile analizate se asociaza cu intensa fibrogeneza conjunctiva, angiogeneza, si inconsistent cu infiltrat inflamator. Aceasta situatie susţine ideea conform căreia inducerea unei necroze complete a masei tumorale tinta, interesind inclusiv masa celulara in vecinatatea de mai multi milimetri in parenchimul hepatic, poate fi un parametru care sa conditioneze eficienta procedurii de termonecrozare cu vapori de apa.

În contextul tratamentului metastazelor hepatice prin termonecroză, considerăm că

reemergenţa tumorală se poate instala (1) prin focare de celule maligne restante, ce au supravieţuit tratamentului termic şi s-au reactivat din starea de dormantă asociată remodelării cicatriceale iniţiale, sau (2) prin recolonizarea unui pat conjunctiv permisiv indus post-termonecrotic, în momentul încetării statusului de *"stupor"* al metastazelor remanente indemne - situaţie care presupune şi implicarea unui mecanism imunologic.

Maniera neconventionala in care am analizat datele imuno-morfologice, accentuind o tenta functionala derivată dintr-o imagine statica, inghetata temporal, are ca motivatie puterea prognostica remarcabila a markerilor imunohistochimici - acceptată prin demonstrarea faptului că unii parametri de agresivitate tumorala contribuie, cu pondere statistica majora, in analizele multivariate, la identificarea unor profiluri evolutive distincte.

CONCLUZII

Procesul de dezvoltare a metastazelor hepatice se bazează pe interacţiunile celulare şi moleculare care au loc la nivelul micromediului hepatic metastazat. Eficienţa sistemelor terapeutice depinde de gradul în care identifică, includ şi controlează ţintele relevante ale acestor interacţiuni. În tratamentul chirurgical al metastazelor hepatice, termonecroza cu vapori de apă se individualizează prin necrozarea rapidă a masei tumorale tinta şi a parenchimului hepatic adiacent, cu diminuarea riscului de reemergenţă tumorală.

BIBLIOGRAFIE

1. Wyld L, Gutteridge E, Pinder SE, James JJ, Chan SY, Cheung KL, Robertson JFR, Evans AJ. Prognostic factors for patients with hepatic metastases from breast cancer. *Brit J Cancer* 2003; 89: 284-290.
2. Allen WL, Johnston PG. Role of genomic markers in colorectal cancer treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23(20): 4545-4552.
3. Hurwitz H. New combinations in metastatic colorectal cancer: what are our expectations? *Oncologist* 2005; 10: 320-322
4. Topala B, Aertsb JL, Roskamsc T, Fieuwsd S, VanPelte J, Vandekerckhoveb P, Penninckx P. Cancer cell dissemination during curative surgery for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 506-511
5. Kokudo N, Imamura H, Sugawara Y, SakamotoY, Yamamoto J, Seki M, Makuuchi M. Surgery for multiple hepatic colorectal metastases. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 84-91.
6. Curley SA. Radiofrequency ablation of malignant liver tumors. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 338-347.
7. Christophi C, Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V. Long-term survival of patients with unresectable colorectal liver metastases treated by percutaneous interstitial laser thermotherapy. *World J Surg* 2004; 28: 987-994.
8. Hiltbrand E, Belenger J, Binzoni T, Buchegger F, Costa M, Mehier H. A new method of thermoablation with hot water vapour for localized tumours. *Anticancer Res* 2004; 24(5A): 2757-2763.
9. Bilchik AJ, Wood TF, Allegra DP. Radiofrequency ablation of unresectable hepatic malignancies: lessons learned. *Oncologist* 2001; 6: 24-33.
10. Hamady ZR, Kotru A, Nishio H, Lodge JPA. Current techniques and results of liver resection for colorectal liver metastases. *Brit Med Bull* 2004; 70: 87-104.
11. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-825.

12. Jewell AP. Is the liver an important site for the development of immune tolerance to tumours? *Med Hypotheses* 2005; 64 (4): 751-754.
13. Chattopadhyay S, Chakraborty NG, Mukherji B. Regulatory T cells and tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54 (12): 1153-1161
14. Glick AB, Yuspa SH. Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 75-83.
15. Mitra R, Singh S, Khar A. Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med* 2003; 5: 1-19.
16. Rudmik LR, Magliocco AM. Molecular mechanisms of hepatic metastasis in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2005; 92 (4): 347-359.
17. Chang J, Clark GM, Allred DC, Mohsin S, Chamness G, Elledge RM. Survival of patients with metastatic breast carcinoma: importance of prognostic markers of the primary tumor. *Cancer* 2003; 97 (3): 545-553.
18. Stessels F, Van den Eynden G, Van der Auwera I, Salgado R, Van den Heuvel E, Harris AL, Jackson DG, Colpaert CG, van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *Br J Cancer* 2004; 90 (7): 1429-1436.
19. Hui A-M, Shi Y-Z, Li X, Sun L, Guido T, Takayama T, Makuuchi M. Proliferative marker Ki-67 in gallbladder carcinomas: high expression level predicts early recurrence after surgical resection. *Cancer Lett* 2002; 176: 191-198.
20. Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum: an analysis of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53, CD44, bcl-2. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 (7): 837-841.
21. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.
22. Kitabatake T, Kojima K, Fukasawa M, Beppu T, Futagawa S. Correlation of thymidine phosphorylase staining and the Ki-67 labeling index to clinicopathologic factors and hepatic metastasis in patients with colorectal cancer. *Surg Today* 2002; 32 (4): 322-328.
23. Smith DL, Soria JC, Morat L, Yang Q, Sabatier L, Liu DD, Nemr RA, Rashid A, Vauthey JN. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and Ki-67 are better predictors of survival than established clinical indicators in patients undergoing curative hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg Oncol* 2004; 11 (1): 45-51.
24. Onodera H, Mori A, Nagayama S, Fujimoto A, Tachibana T, Yonenaga Y, Tsuruyama T. Fas/CD95 signaling rather than angiogenesis or proliferative activity is a useful prognostic factor in patients with resected liver metastases from colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 477-484.
25. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Altered growth patterns of colorectal liver metastases after thermal ablation. *Surgery* 2006; 139: 73-81.
26. Meyers MO, Watson JC. Angiogenesis and hepatic colorectal metastases. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12 (1): 151-163.
27. Murray JC, Symonds P, Ward W, Huggins M, Tiga A, Rice K, Heng YM, Todd I, Robins RA. Colorectal cancer cells induce lymphocyte apoptosis by an endothelial monocyte-activating polypeptide-II-dependent mechanism. *J Immunol* 2004; 172: 274-281.
28. Papanikolaou IS, Lazaris AC, Apostolopoulos P, Kavantzas N, Papas MG, Mavrogiannis C, Patsouris ES, Archimandritis A. Tissue detection of natural killer cells in colorectal adenocarcinoma. *J Gastroint Surg* 2006; 10 (7): 960-973.
29. Waldner M, Schimanski CC, Neurath MF. Colon cancer and the immune system: The role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(45): 7233-7238.
30. Oosterling SJ, Mels AK, Geijtenbeek TBH, van der Bij GJ, Tuk CW, Vuylsteke RJCLM, van Leeuwen PAM, Meijer GA, Meijer S, Beelen RHJ, van Egmond M. Preoperative granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) increases hepatic dentritic cell numbers and clustering with lymphocytes in colorectal cancer patients. *Immunobiology* 2006; 211: 641-649.

31. van der Bij GJ, Oosterling SJ, Meijer S, Beelen RHJ, van Egmond M. Therapeutic potential of Kupffer cells in prevention of liver metastases outgrowth. *Immunobiology* 2005; 210: 259-265.
32. Gulubova MV. Collagen type IV, laminin, á -smooth muscle actin (á SMA), á1 and á6integrins expression in the liver with metastases from malignant gastrointestinal tumours. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21 (6): 485-494.
33. Frich L, Bjornland K, Pettersen S, Clausen OPF, Gladhaug IP. Increased activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 after hepatic radiofrequency ablation. *J Surg Res* 2006; 135: 297-304.
34. Illemann M, Bird N, Majeed A, Sehested M, Laerum OD, Lund LR, Dano K, Nielsen BS. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. *Mol Cancer Res* 2006; 4 (5): 293-302.

NOUTĂŢI

HEPATITA E CRONICĂ – O NOUĂ AMENINŢARE PENTRU PACIENŢII CU TRANSPLANT

Virusul hepatitei E (VHE) este un virus cu transmitere orofecală. Cu excepţia a două cazuri descrise în literatura de specialitate, VHE era considerat ca fiind responsabil de hepatite acute care nu evoluau spre cronicizare. Două articole publicate in *NEJM* repun în discuţie această problemă. Kamar N et al., din Toulouse, au evaluat existenţa unei hepatite cu VHE (HVE) pe o serie de pacienţi care au beneficiat de un transplant de ficat sau rinichi (izolate sau asociate cu o grefă de pancreas). Pacienţii au fost identificaţi printre cei 217 care au prezentat o creştere a nivelelor serice ale enzimelor hepatice, în absenţa unei hepatite cronice B, C sau D, a unei cauze toxice, medicamentoase, sau a unor afecţiuni ale căilor biliare. Dintre cei 217 pacienţi, 14 au prezentat o infecţie acută cu VHE, atestată prin evidenţierea ARN-ului viral în ser. Aceasta a fost asimptomatică în 7 cazuri şi s-a manifestat prin astenie, artralgii şi mialgii la ceilalţi 7 pacienţi (asociate la un singur pacient cu o scădere importantă în greutate şi icter); simptomele au dispărut în aproximativ două saptămâni. Biopsia hepatică, practicată în afara fazei acute, a evidenţiat la 9 subiecţi un scor Metavir mediu activitate (1,3) şi de fibroză (0,9): scorurile de activitate sunt de la 0 la 3, iar cele de fibroză de la 0 la 4. După diagnostic nu s-a modificat tratamentul antidepresor, pacienţii fiind supravegheaţi timp de 12 luni: 6 s-au videcat complet (dispariţia ARN-ului viral în sânge şi fecale), iar 8 au dezvoltat o hepatită cronică (persistenţa valorilor crescute pentru enzimele hepatice) şi prezenţa ARN-ului viral. O a doua biopsie hepatică efectuată la 6 din cei 8 pacienţi a reconfirmat scoruri medii Metavir de activitate şi de fibroză, respectiv 2 şi 1,8. Subiecţii imunodeprimaţi ca urmare a unui tratament antirejet sunt expuşi unei VHE cronice (îndeosebi în regiunile unde acest virus circulă). Singurul factor de risc pentru cronicizare ce poate fi evocat pe acest număr mic de subiecţi pare a fi infecţia acută aparută relativ recent dupa transplant, perioada în care în special limfocitele CD2, CD3 şi CD4 sunt scăzute. Aceste observaţii sunt confirmate de Gérolami R et al., din Marsilia, care au raportat un caz de HVE ce a evoluat spre ciroza (confirmată prin biopsie) la 2 ani după un transplant renal. Aceste câteva cazuri impun cautarea ARN-ului VHE la pacienţii care au suferit un transplant (şi, poate, la toţi subiecţii imuodeprimaţi), atunci când aceştia prezintă o creştere inexplicabilă a nivelului seric al enzimelor hepatice şi supravegherea pacienţilor pozitivi pentru VHE. Problema tratamentului pentru aceste forme de hepatită cronică rămâne de discutat, de asemenea şi interesul unei eventuale vaccinări înainte de trasplant, atunci când vaccinul va fi disponibil (Kamar N et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipiens. *N Engl J Med* 2008; 358: 811-817; Gérolami R. et al. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med* 2008; 358: 859-860).

Al.D. Ciochină

MODEL ANIMAL DE SDRA

R.G. Grigoriu[1], Raluca Bălan[2], V. Rusu[2]
1 Spitalul Clinic de Obstetrică şi Ginecologie "Elena Doamna" Iaşi
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
2 Disciplina de Biofizică şi Medicină Nucleară

ANIMAL MODEL OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (Abstract): Studying the animal models of acute respiratory distress syndrome (ARDS) represents a key factor in understanding the pathophysiology of this condition. **Objective**: Creating a simple animal model of ARDS based on oleic acid injection, suitable for studying the alveolo-capillary membrane dysfunction. **Material and method**: 8 common rabbits weighting between 3 and 3.5 kg were subjected to peripheral vein injection of 0.5 ml of oleic acid. During the first 75 minutes chest radiographs were performed at each 15 minutes. At the end of this period an arterial blood-gas analysis was done, the animals were sacrificed and a complete autopsy and a microscopic examination of the lung were performed. **Results**: Clinical, radiologic and histological features of ARDS were obtained in all cases after 75 minutes of oleic acid injection. **Conclusion**: Intravenous injection of oleic acid consistently induces ARDS in rabbits. The model is simple, reproducible and suitable for animal experimentation. **Key words**: ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME, RABBIT, ANIMAL MODEL

Sindromul de detresă respiratorie acută (SDRA) reprezintă una din cele mai studiate patologii întâlnite în secţiile de terapie intensivă. Mortalitatea mare (circa 40%) care se menţine în ciuda progreselor în terapia suportivă au motivat cercetările îndreptate spre înţelegerea mecanismelor fiziopatologice şi spre evaluarea unor noi metode de diagnostic precoce şi tratament (1). În ambele cazuri cercetarea se bazează pe studierea unor modele animale de SDRA înainte de testarea ipotezelor la om. În funcţie de etiologia factorului declansator, modelele animale, ca şi SDRA, pot fi clasificate în modele prin agresiune pulmonară directă, modele cu agresiune pulmonară indirectă şi modele bazate pe agresiune mixtă (agenţi infecţioşi) (2). Definiţia din 1994 a SDRA ca şi numeroase studii ulterioare arată rolul cheie al barierei alveolo-capilare în apariţia şi evoluţia bolii (3,4). Bariera alveolo-capilară poate fi divizată cel puţin didactic într-o componentă capilară (endotelială) şi una epitelială. Dat fiind că numeroase studii sunt dirijate spre detecţia alterărilor funcţionale fie a endoteliului vascular fie a epiteliului respirator este utilă o clasificare a modelelor animale în funcţie de zona iniţial afectată. Astfel putem individualiza:

I. Modelele cu afectare preferenţial/ primar epitelială

a. Injectarea intratraheală de acid clorhidric (model bifazic). Este un model animal inspirat de sindromul Mendelson. Leziunile sunt iniţial epiteliale prin agresiunea acidului clorhidric. Ulterior apare un sindrom inflamator ce cuprinde întregul plămân.

II. Modelele cu afectare preferenţial/ primar endotelială

a. Expunerea prelungită la concentraţii crescute de oxigen. Animalul de experienţă

este ventilat sau respiră spontan (sub un clopot) la o fracţie inspiratorie a O2 de peste 60%. Leziunea apare în 2-3 zile, are la bază generarea de specii reactive de oxigen, şi este în principal endotelială cu afectarea permeabilităţii capilare.

b. Injectarea intratraheală de bleomicina. Se caracterizează prin creşterea permeabilităţii capilare şi apariţia edemului interstiţial. Ulterior apare fibroza pulmonară.

c. Injectarea intravasculară de acid oleic.

d. Injectarea intraperitoneală de alpha-naphthylthiourée. Agresiunea asupra endoteliului microvascular pulmonar pare fi realizată prin intermediul speciilor reactive de oxigen.

e. Arsura pe suprafaţă întinsă. Arsura trebuie să depăşească 30-40% din suprafaţa corporală. Se caracterizează printr-o afectare a permeabilităţii capilare pulmonare.

III. Modelele fără lezare iniţială epitelială sau endotelială

a. Depleţia surfactantului pulmonar prin lavaj cu apă salină. Constă în instilarea şi aspirarea repetată de NaCl 0.9% în arborele bronşic. Această spălare a plămânului determină scăderea surfactantului pulmonar cu scăderea complianţei pulmonare şi favorizarea apariţiei zonelor de atelectazie.

b. Injectarea intratraheală de detergent Tween 20. Principiul rezidă în inactivarea surfactantului pulmonar. Ca şi în cazul lavajului alveolar salin aceste modele nu au o componentă inflamatorie şi prin urmare asemănarea cu SDRA este limitată.

c. Şoc hemoragic reanimat. Se bazează pe descărcările importante de citokine ca urmare a pierderii de volum sangvin (>30%). Este un model prin excelenţă inflamator.

IV. Modele mixte

a. Injectarea de endotoxină. Injectarea de lipopolizaharid (LPS) poate fi intratraheală intravasculară sau intraperitoneală.

b. Ligatura şi puncţia cecală. SDRA apare ca urmare a peritonitei şi sepsisului ce se dezvoltă în timp.

c. Pneumonii bacteriene.

Existenţa numeroaselor modele animale arată nu doar interesul ştiinţific ci mai ales imposibilitatea ca un singur model să acopere toate modificările fiziopatologice ce apar în SDRA. Alegerea unui anumit model va fi în funcţie de ipoteza de lucru a fiecărei investigaţii. De exemplu urmărirea rolului neutrofilelor în apariţia SDRA va impune alegerea modelului LPS, urmărirea formării membranelor hialine va determina alegerea modelului HCl iar urmărirea permeabilităţii capilare pulmonare va favoriza modelul acidului oleic.

Modelul acidului oleic (AO). Reprezintă unul din cele mai utilizate modele animale şi se bazează pe injectarea intravasculară de acid oleic. Acidul oleic este un acid gras nesaturat şi a fost utilizat iniţial în modelele de embolie pulmonară. Ulterior s-au remarcat efectele sale asupra pulmonului, injectarea sa intravasculară generând SDRA (2). Mecanismul de acţiune pare a fi toxicitatea directă asupra celulelor endoteliale prin peroxidarea lipidelor de la nivelul membranei celulare. Astfel studiile efectuate atât pe celule endoteliale pulmonare *in vivo* cât şi *in vitro* arată un fenomen de separare a celulelor endoteliale de membrana bazală rapid după injectarea AO (5). Microscopia electronică arată modificări de tipul vacuolizare şi umflare celulară (6). Parte din disfuncţia membranară endotelială pare a fi explicată prin inhibarea directă a pompei de Ca şi ATPazei Na/K (3,4). Implicarea speciilor reactive de oxigen (SRO) nu este clară, la ora actuală existând atât studii care susţin această teorie cât şi studii care neagă rolul SRO în patogeneza SDRA prin acid oleic (7,8,9). Posibilul rol al SRO este în lezarea secundară a epiteliului alveolar (10). Deşi participarea PMN în fazele tardive a SDRA (după 4h) este stabilită, implicarea lor în fazele inci-

piente în acest model este încă dezbătută (11,12). Unii autori consideră că infiltrarea PMN a spaţiului interstiţial şi alveolar are loc ca urmare a unui pasaj pasiv prin bariera endotelială lezată iar PMN nu sunt indispensabile dezvoltării SDRA (13). Anatomopatologic acidul oleic determină leziuni pulmonare difuze, eterogene asociind leziuni endoteliale, tromboza capilară, edem şi infiltrat cu PMN interstiţial şi alveolar.

Model animal pe iepure. Scopul acestei lucrări a fost crearea unui model animal *in vivo* de SDRA pentru investigarea tulburărilor de permeabilitate endotelială. Particularitatea modelului rezidă în simplitatea sa. Nu s-a folosit aparatură sofisticată (respirator) sau manevre invazive (cateter pulmonar, denudări). Iepurele a fost ales ca un compromis, talia fiind destul de mare ca să permită investigaţii imagistice dar în acelaşi timp convenabilă din punct de vedere al consumului de substanţe.

MATERIAL ŞI METODĂ

Materiale necesare :

· Iepure. Au fost alese exemplare cântărind între 3200 gr şi 3500 gr. S-a preferat această greutate deoarece la exemplarele mai mici este dificilă canularea venoasă şi arterială iar imaginea radiografică este mai greu de interpretat. Exemplarele mai mari necesită administrarea unor doze mai mari de acid oleic (peste 0.5 ml) şi nu aduc un beneficiu major privind rezoluţia radiografică.

· Acid oleic de puritate 99% fiole de 1 ml (Număr de catalog O1008; Sigma Chemical).

· Seringi de 5 ml integral din sticlă.

Pentru canularea venoasă a fost aleasă vena dorsală a urechii (fig. 1) datorită calibrului mare şi uşurimii evidenţierii. Pentru recoltarea de sânge arterial s-au folosit 2 surse : artera de pe faţa dorsală a urechii (fig. 2) sau, în cazul calibrului mic, s-a recurs la artera femurală de pe faţa internă a coapsei. Cu o zi înaintea experimentului animalele au fost tunse şi apoi rase pe faţa dorsală a ambelor urechi şi eventual pe faţa internă a unei coapse. Deşi iniţial pregătirea urechii s-a efectuat prin sedarea iepurelui prin administrarea intramusculară de diazepam 3 mg/kgc ulterior s-a remarcat că o manipulare blândă este suficientă. Canularea venoasă s-a realizat imediat înaintea experimentului. S-au folosit flexule pediatrice de 24G. Un ajutor imobilizează urechea iepurelui şi realizează o uşoară pre-

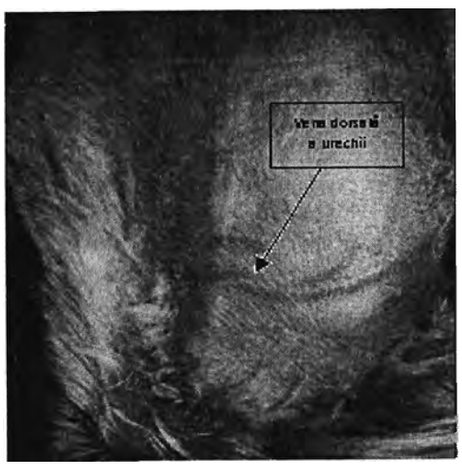


Fig. 1. Vena dorsală a urechii

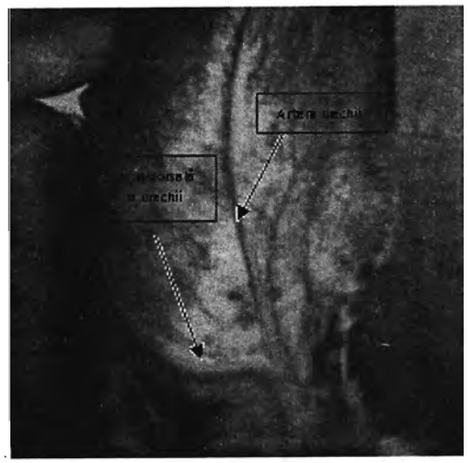


Fig. 2. Vena şi artera dorsală a urechii

siune la baza urechii care serveşte ca garou. Inserţia cateterului se face cu o tehnică standard cu menţiunea că pielea este dură iar forţarea cateterului poate duce la transfixierea venei. În astfel de situaţii am preferat preperforarea pielii cu un ac de 18G şi ulterior montarea cateterului. Nu recomandăm puncţionarea prea aproape de baza urechii deoarece în astfel de cazuri au existat probleme la avansarea cateterului. Se recomandă fixarea foarte atentă a flexulei eventual printr-o bandă de leucoplast de ureche pentru a evita smulgerea ei accidentală.

Injectarea acidului oleic. Se pregăteşte o seringă de 5 ml cu ser fiziologic. Se pregătesc seringile de sticlă cu care se va injecta acidul oleic. Seringile trebuie să fie din sticlă pentru a evita reacţia între acidul oleic şi cauciuc sau plastic. Se scoate din congelator acidul oleic. Păstrarea fiolelor de acid oleic se face la congelator la -20 grade Celsius şi ferit de lumină pentru a evita inactivarea acestuia. S-a preferat folosirea de fiole de 1ml deoarece permit efectuarea de loturi de 2 iepuri. Păstrarea acidului oleic după deschiderea fiolei este practic imposibilă în condiţii obişnuite, inactivarea sa fiind rapidă. Fiola este încălzită la temperatura camerei prin ţinerea ei în mână. Se sparge fiola şi folosind seringa de sticlă se aspiră cantitatea de acid oleic necesară pentru un iepure. La greutatea mai sus menţionată practic împărţim fiola în 2 adică câte 0.5 ml per iepure ceea ce corespunde cu 0.15 ml/kg. Cei 0.5 ml se administrează în 5 reprize la 5 minute interval. La fiecare repriză într-o seringă de 5 ml de sticlă se aspiră 0.1 ml de acid oleic şi apoi NaCl 0.9% până la 2 ml . Se agită bine amestecul şi se injectează lent. Apoi pentru spălarea flexulei se injectat 1 ml de NaCl 0.9%.

Înaintea fiecărei injectări este necesară agitarea seringii pentru un bun amestec. Nu recomandăm injectarea unei cantităţi mai mari de acid oleic per repriză deoarece apare riscul unei embolii grăsoase masive şi moartea animalului. Am preferat injectarea fracţionată pentru a putea observa efectul fiecărei injectări asupra animalului. În cazul în care dispneea devine foarte severă se poate opri administrarea pentru a nu pierde animalul. De asemenea nu este recomandat ca doza totală de acid oleic să depăşească 0.15 ml/kgc deoarece numărul de animale care decedează rapid prin edem pulmonar masiv creşte dramatic. Înaintea injectării am realizat o gazometrie arterială.

După injectarea cantităţii totale de acid oleic s-au realizat radiografii pulmonare din 15 în 15 minute iar la 1h-1h15 s-a realizat din nou o gazometrie arterială. Pentru efectuarea radiografiilor s-a folosit un aparat Mercury 332 (Villa Sistemi Medicali, Milano Italia). Parametrii folosiţi au fost 50KV, 100 mA, 16ms, DAP de 1,3μGy/m^2. Pe radiografiile seriate se observă modificările concomitente dezvoltării SDRA pulmonar.

Pentru gazometrie am utilizat o seringă de 1 ml cu ac de insulină (27G). Se pot utiliza seringi de 2 ml cu ac de 23G însă datorită grosimii acului la înţeparea pielii aceasta opune rezistenţă mare iar după depăşirea ei rata de transfixiere a arterei şi hematom auricular este mult crescută. În vederea interpretării rezultatelor menţionăm că pe tot parcursul experimentului iepurii au respirat aer atmosferic.

După ultima recoltare de sânge arterial iepurii au fost sacrificaţi, s-au scos plămânii, s-au realizat poze pentru macroscopie şi apoi s-au prelevat fragmente prelucrate ulterior la parafină conform tehnicilor de rutină. Ulterior fragmentele au fost secţionate la 4 μm şi colorate uzual cu hematoxilin-eozină :

a. Colorare cu hematoxilină Herlich, 45 minute ;

b. Spălare cu apă de robinet până ce secţiunile se albăstresc, 5 minute.

c. Diferenţiere în 1% acid-alcool (1%

HCL în alcool 70%), 5-10 secunde.

d. Spălare cu apă de robinet, până ce secţiunile se realbăstresc, 5 minute.

e. Colorare cu eozină 1%, 10 minute.

f. Spălare în apă de robinet, 1-5 minute.

REZULTATE

Din 10 animale intrate în studiu unul a murit rapid după injectare (s-a încercat administrarea întregii cantităţi ca un singur bolus) şi unul a murit la circa 10 minute după un regim de administrare accelerată a întregii cantităţi în 10 minute. În ambele cazuri a doua gazometrie nu a mai putut fi efectuată dar radiografia pulmonară post-mortem a celui de al doilea caz arată un edem pulmonar masiv. La examenul morfopatologic la primul iepure s-a evidenţiat o embolie pulmonară masivă iar în al doilea caz microtromboze şi hemoragii pulmonare.

În continuare vom prezenta rezultatele următorilor 8 iepuri la care regimul de administrare a fost cel menţionat în material şi metodă.

TABELUL I

Gazometrie înainte de administrarea acidului oleic

	1	2	3	4	5	6	7	8
PaO_2(mmHg)	100,3	107,8	99,8	100,1	98,9	100,1	99	103,1
$PaCO_2$(mmHg)	37	36,7	38,0	37	36,9	37	38	36,8
HCO_3(mmol/l)	25,5	24,6	26,2	25,5	25,4	25,4	26	25,2
pH	7,457	7,443	7,420	7,457	7,441	7,449	7,421	7,448

TABELUL II

Gazometrie la 75 minute de la administrarea acidului oleic

	1	2	3	4	5	6	7	8
PaO_2(mmHg)	48,6	50,1	57,9	48,5	60,1	48,5	57,1	47,9
PaO2/FiO2	231	238	275	230	286	230	271	228
$PaCO_2$(mmHg)	29,6	30,1	32,2	29,4	34	29,4	32	29,5
HCO_3(mmol/l)	18,5	19,0	19,4	18,5	21	18,5	18,4	18,5
pH	7,413	7,402	7,399	7,412	7,411	7,412	7,411	7,413

Fig. 3. Desen pulmonar normal

Fig. 4. Accentuarea desenului interstiţial hiliobazal

Gazometrie. Se observă că în toate cazurile criteriul gazometric (PaO2/FiO2 <300) pentru injurie pulmonară acută (ALI) a fost îndeplinit iar în 5 cazuri este îndeplinit şi criteriul de SDRA (PaO2/FiO2 <200) (tab. I, tab. II).

Radiologic. În toate cazurile criteriul de ALI a fost îndeplinit observându-se infiltrate pulmonare şi edem difuz. În continuare se pot observa 4 radiografii seriate la 15 minute interval pentru evidenţierea apariţiei şi dezvoltării edemului. Se remarcă trecerea de la un desen pulmonar normal în figura 3 la accentuarea desenului interstiţial hiliobazal bilateral în figura 4. La 75 minute se observă ştergerea moderată a conturului şi structurilor pulmonare cu apariţia aspectului de geam mat (fig. 5). Figura 6 arată dezvoltarea unui edem pulmonar masiv care a dus la moartea animalului în cazul administrări accelerate (în 10 minute) a întregii cantităţi de acid oleic.

Anatomopatologic. Sacrificarea animalelor de experienţă la 75 minute de la in-

Fig. 5. Aspect de geam mat

Fig. 6. Edem masiv pulmonar

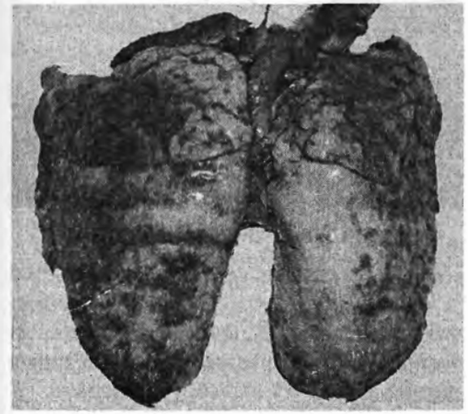


Fig. 7. Plămân de iepure cu SDRA

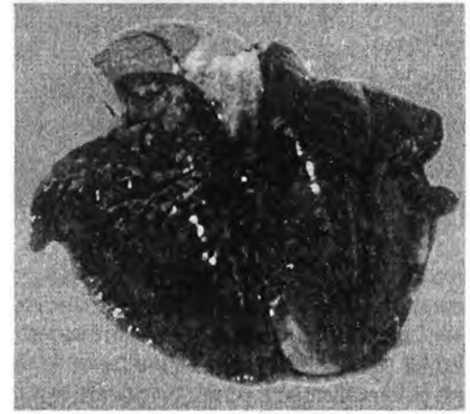


Fig. 8. Plămân de iepure cu SDRA

Fig. 9. Edem alveolar, infiltrat inflamator interstiţial, HE x10

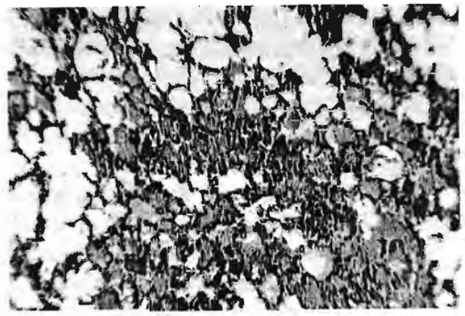


Fig. 10. Edem alveolar focal, HE x5

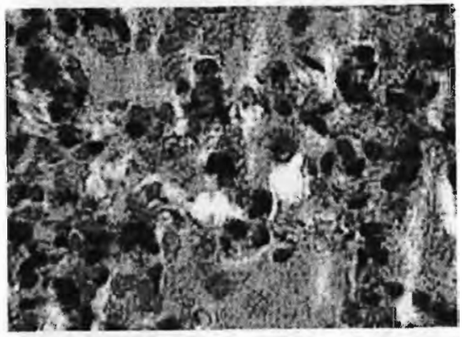


Fig. 11. Edem şi hemoragie intra-alveolară, HE x40

Fig. 12. Edem alveolar, septuri interalveolare îngroşate, infiltrat inflamator interstiţial, HE x40

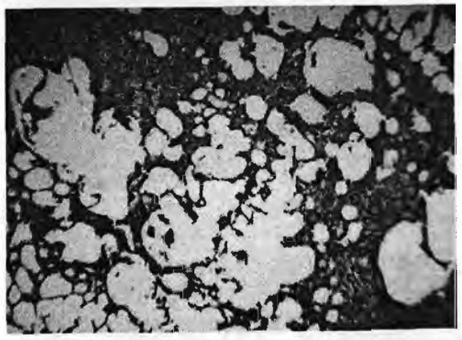


Fig. 13. Edem alveolar focal, HE x5

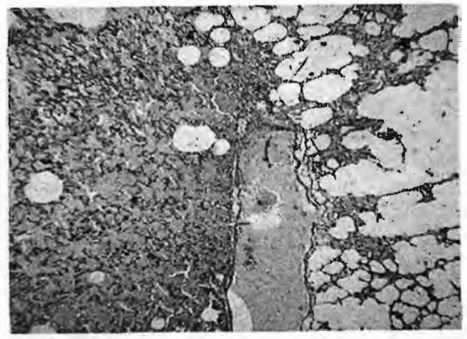


Fig. 14. Edem alveolar focal, HE x5

jectarea acidului oleic surprinde SDRA în fazele incipiente. Macroscopic plămânii sunt grei (prin acumulare de lichid proteic iniţial la nivel interstiţial şi ulterior şi la nivel intraalveolar), fermi, de culoare roşie/ roşie-albăstruie, de consistenţă „noroioasă" (fig. 7). Prezintă congestie, edem interstiţial şi intraalveolar. Focal plămânii au consistenţa mai încărcată (datorită inflamaţiei şi edemului), aspect mai proeminent în zonele inferioare.

Microscopic modificările histologice

concură cu etapa din dezvoltarea SDRA. Se remarcă apariţia lezării alveolare difuze în fază incipientă reprezentată prin edem, hemoragie intra-alveolară şi depunere de fibrină (fig. 8).

DISCUŢII

Injectarea de acid oleic reprezintă una din metodele cele mai utilizate în realizarea modelelor animale de SDRA. Generarea *in vivo* a SDRA se bazează cel mai frecvent pe injectarea în artera pulmonară de acid oleic. Motivul injectării în artera pulmonară este asigurarea că suficient acid oleic ajunge la nivel microcapilar pulmonar pentru a genera SDRA, ştiut fiind că reacţia cu endoteliul este imediată. Cateterizarea arterei pulmonare este însă dificilă şi presupune utilizarea de material scump şi greu procurabil (cateter swan ganz). Scopul acestui studiu a fost realizarea unui model uşor şi rapid de executat evitându-se orice manevră invazivă de tip denudare, cateterizare venoasă centrală, ventilaţie mecanică etc. Prin canularea venoasă periferică şi injectare de acid oleic în cantitate crescută s-a reuşit obţinerea unui model animal de SDRA. În plus modelul este realizabil în maxim 1h30'. Confirmarea apariţiei ALI/ SDRA s-a bazat pe 3 explorări în conformitate cu definiţia sindromului: raport PaO2/FiO2 <300, radiografie şi examen anatomopatologic. La nici un iepure nu au existat divergenţe între rezultatele obţinute în cele 3 direcţii de investigare fiecare confirmând apariţia SDRA. Dezvoltarea edemului interstiţial s-a reflectat radiologic în ştergerea desenului interstiţial. Apariţia edemului alveolar a condus la aspectul radiografic de geam mat ce corespunde morfopatologic unor plămâni grei încărcaţi cu apă cu zone relativ normal aerate şi zone de condensare (atelectatice). Administrarea manuală, fracţionată a acidului oleic a permis observarea clinică a efectului său şi eventuala oprire a administrării pentru a evita decesul prematur al animalului de experienţă.

CONCLUZII

Cercetările axate pe studierea disfuncţiei membranei capilare în SDRA impun alegerea unui model animal bazat pe acid oleic. Modelul anterior prezentat este reproductibil, uşor realizabil şi necostisitor. Lipsa aparaturii satelite (clopot de sticlă, ventilator, infuzomate) şi talia redusă a iepurelui permit deplasarea rapidă pentru efectuarea diverselor investigaţii imagistice. În acelaşi timp dimensiunile plămânului asigură o rezoluţie bună a imaginilor obţinute. Toate aceste calităţi îl recomandă în experimentele cu model animal de ALI/ ARDS în care este necesar un număr mare de „subiecţi" rapid pregătibili şi mobili spre diversele cabinete de investigare.

BIBLIOGRAFIE

1. Bernard GR, Artigas A et al. The American European consensus on ARDS. *Am J Resp Crit Care Med* 1994; 149: 818-824.
2. Richard JC, Guérin C. Modèles animaux de SDRA. *Réanimation* 2006; 15: 21-28.
3. Lamers JMJ, Stinis HT, Montfoort A, Hiilsmann WC. The effect of lipid intermediates on Ca^{2+} and Na^{+} permeability and (Na^{+}/ K^{+})-ATPase of cardiac sarcolemma, a possible role in myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1984; 774: 127-137.
4. Pine RW, Vincenzi FF, Carrico CJ. Apparent inhibition of the plasma membrane Ca^{2+} pump by oleic acid. *J Trauma* 1983; 23: 366-371.
5. Greg Beilman. Pathogenesis of Oleic Acid-Induced Lung Injury in the Rat: Distribution of Oleic Acid During Injury and Early Endothelial Cell Changes. *Lipids* 1995; 30: 817-823.

6. Grotjohan HP, van der Heijde RMJL, Jansen JRC et al. A stable model of respiratory distress by small injections of oleic acid in pigs. *Intensive Care Med* 1996; 22: 336-344.
7. Hultkvist-Bengtsson U, MaErtensson L. Oleic acid-induced injuries in the guinea-pig: effects of allopurinol on cell dynamics, erythrocyte-catalase and uric acid plasma levels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991; 18: 127-130.
8. Tinsley CH, Tinsley LR, Nishida SD, Premaratne S, McNamara JJ. Measurement of oxygen free radicals in a rabbit shock lung model: effect of superoxide dismutase and retinol. *Arch Surg* 1996; 131: 738-742.
9. Katz SA, Venkatachalam M, Crouch RK, Heffner JE, Halushka PV, Wise WC, Cook JA. Catalase pre-treatment attenuates oleic acid-induced edema in isolated rabbit lung. *J Appl Physiol* 1988; 65: 1301-1306.
10. Schuster DP. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 245-260.
11. Eiermann GJ, Dickey BF. Polymorphonuclear leukocyte participation in acute oleic acid lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1983; 128: 845-850.
12. Moriuchi H, Zaha M, Fukumoto T, Yuizono T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med* 1998; 24: 709-715.
13. Zhou Z, Kozlowski J, Schuster DP. Physiologic, biochemical, and imaging characterization of acute lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 344-351.

NOUTĂŢI

TRITERPENE ŞI STEROLI CU ACŢIUNE ANTIINFLAMATOARE DIN *GANODERMA LUCIDUM* ŞI *G. TSUGAE*

În China extractele brute din *Ganoderma lucidum* şi *G. tsugae* sunt utilizate în tratamentul hepatopatiilor. Este bine cunoscut faptul că mastocitele, neutrofilele şi macrofagele sunt implicate în procesele inflamatorii în timp ce activarea celulelor microgliale joacă un rol important în afecţiunile inflamatorii de la nivelul SNC. Ca urmare, inhibarea activităţii acestor celule reprezintă una din modalităţile de tratament în afecţiunile inflamatorii. Ko et al. au investigat proprietatea unor triterpene şi steroli izolaţi din *Ganoderma lucidum* şi *G. tsugae* de a influenţa eliberarea unor mediatori din mastocite, neutrofile şi macrofage. Dintre toţi compuşii investigaţi, acidul 3-oxo-5alfa-lanosta-8,24-dien-21-oic a inhibat semnificativ eliberarea beta-glucuronidazei din neutrofilele de şobolan stimulate cu formil-metionil-leucil-fenilalanină (fMLF)/citochalazină B (CB) şi a inhibat sinteza de NO de către celulele microgliale N9 stimulate cu lipopolizaharidă (LPS)/interferon-gamma (IFN-gamma). Acidul tsugaric a redus formarea de radical anion superoxid în neutrofilele de şobolan stimulate cu formil-metionil-leucil-fenilalanină (fMLF)/citochalazină B (CB). Aceşti compuşi ar putea fi utilizaţi pentru prevenirea şi tratamentul afecţiunilor inflamatorii centrale şi periferice însoţite de creşterea producţiei de radical anion superoxid, eliberare de beta-glucuronidază şi acumulare de NO în celulele inflamatorii. Îmbătrânirea pielii şi apariţia de cancere dermice sunt parţial datorate expunerii la radiaţiile UV. Radiaţiile UVA (320-400 nm) şi UVB (280-320 nm) joacă un rol important în iniţierea proceselor de fotocarcinogeneză. Radiaţiile UV generează specii reactive ale oxigenului care produc leziuni oxidative la nivelul mitocondriilor şi ADN-ului nuclear; aceste leziuni accelerează procesul de îmbătrânire şi conduc la carcinogeneză. Acidul tsugaric a protejat keratinocitele umane de leziunile oxidative induse de expunerea la UVB şi, ca urmare, ar putea fi utilizat la obţinerea de preparate cu acţiune dermoprotectoare (Ko H-H, Hung C-F, Wang J-P, Lin C-N. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry* 2008; 69: 234-239).

Anca Miron

EXPRESIA Ki-67 ŞI p53 ÎN CORELAŢIE CU GRADUL DE DIFERENŢIERE AL ADENOCARCINOMULUI COLONIC

O. Petrişor[1], Simona-Eliza Giuşcă[2], Maria Sajin[3], Gioconda Dobrescu[4]
Spitalul Militar de Urgenţă "Dr. Aristide Serfioti" Galaţi
1 Secţia Medicală I
Spitalul Clinic Judeţean Universitar de Urgenţă "Sf. Spiridon" Iaşi
2 Clinica I Chirurgie
Universitatea de Medicină şi Farmacie "C. Davila" Bucureşti
Facultatea de Medicină
3 Catedra de Morfopatologie
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
4 Disciplina de Histologie

Ki-67 AND p53 EXPRESSIONS VERSUS DIFFERENTIATION DEGREES OF COLON ADENOCARCINOMA (Abstract): **Purpose**: The colon carcinoma prognostic is evaluated with respect to four categories of factors established by College of American Pathologists Consensus Statement 1999, among which a series of molecular markers is also included. Our study aimed to develop semiquantitative analysis of the immunohistochimic pattern for proliferation and apoptosis markers, as well as of their connections with the histopatological subtypes of colon adenocarcinoma. **Material and methods**: The group of study included 5 cases of well-differentiated adenocarcinoma, 5 cases of moderately differentiated adenocarcinoma and 5 cases of poor differentiated adenocarcinoma. The Ki-67 and p53 antibodies (DAKO) and the streptavidin-biotin method (LSAB Kit, DAKO) were used for the immunohistochemical staining. The semiquantitative analysis provided the Ki-67 and p53 indices, and subsequently their values were statistically correlated with the histologic differentiation degrees. **Results**: All the cases presented positive immunohistochemistry reaction for Ki-67, the Ki-67 index varying on a large scale, between 5% and 95%. For p53, 10 out of the 15 cases (66%) presented positive immunohistochemistry reaction, with the index value between 22% and 95%, and 5 cases were negative. The statistical analysis revealed no significant difference between the Ki-67 indices of the three histopathologic subtypes ($p = 0.674$), whereas important differences appeared for the p53 indices ($p = 0.007$). **Conclusion**: Our findings support the correct understanding of the role played by the immunohistochemical markers, in the sense of the risk involved by considering a pre-definite hierarchy in the diagnosis strategy. **Key words**: COLONIC ADENOCARCINOMA, Ki-67, p53

Cancerul colorectal este o afecţiune genetică dobândită în cadrul unui proces de carcinogeneză multistadială, constând în acumularea unui număr critic de evenimente genetice sub influenţa carcinogenilor din mediu (1,2). Creşterea progresivă a incidenţei si creşterea frecventei tumorilor localizate proximal constituie principalele tendinţe epidemiologice ale carcinomului colorectal (3). Aproximativ 70-80% dintre pacienţii cu cancer colorectal prezintă în momentul diagnosticului o tumoră localizată, rezecabilă chirurgical (4). Dintre aceştia, o mică parte dezvoltă micrometastaze

oculte şi vor prezenta recăderi după terapia iniţială. De aceea, rata supravieţuirii la 5 ani a pacienţilor cu cancer colorectal, trataţi prin rezecţie, este peste 50% în majoritatea studiilor, depinzând de stadiul tumorii (4,5,6). În cazurile cu evoluţie nefavorabilă, majoritatea deceselor (90%) apare la pacienţi cu metastaze în ganglionii limfatici loco-regionali şi/sau recurenţe locale (3,4,5,6). Pentru aceşti pacienţi, este indicată terapia adjuvantă: chimioterapie (7) asociată cu radioterapie, în cazul carcinomului rectal (8). Răspunsul la terapie variază de la un pacient la altul, prognosticul cancerului colorectal fiind influenţat de următorii factori: stadiul tumorii, tabloul histopatologic/gradul de diferenţiere, caracteristicile genetice, moleculare şi imunologice, tratamentul aplicat, factorii clinici (9,10,11,12).

Studiile cu variabile multiple consideră gradul de diferenţiere a tumorii un factor independent de prognostic (11,13). Cu cât carcinomul este mai slab diferenţiat, cu atât este mai invaziv în perete şi are potenţial mai crescut de metastazare în ganglionii limfatici şi/sau la distanţă (11). Utilitatea acestui parametru este limitată de variabilitatea interobservaţională (14). Stadiul tumorii şi factorii moleculari, corelaţi cu datele clinice, pot avea semnificaţie prognostică (11,15). Astfel, pot fi decelate grupele de pacienţi cu risc crescut (care ar putea beneficia de tratament adjuvant), de pacienţi cu risc scăzut (la care chimioterapia nu este strict necesară), evitându-se astfel efectele toxice secundare. Factorii moleculari sunt utili în identificarea răspunsului la tratament, ajutând la alegerea acestuia, panelul de markeri imunohistochimici utilizaţi în studiul carcinomului colorectal fiind foarte larg (11,16).

Pornind de la datele din literatură, mai mult sau mai puţin concordante în ceea ce priveşte valoarea predictivă pentru evoluţia clinică a markeri moleculari Ki-67 şi p53, ne-am propus evaluarea semicantitativă, într-un studiu retrospectiv, a pattern-ului imunohistochimic caracteristic pentru proliferare şi apoptoză. Abordarea noastră se individualizează, ca elemente de originalitate, prin compararea profilului imunohistochimic pentru markerii Ki-67 şi p53 în subtipuri histopatologice de adenocarcinom colonic.

MATERIAL ŞI METODĂ

Au fost investigate 15 cazuri de adenocarcinom colonic (câte 5 cazuri corespunzătoare formei bine diferenţiate, moderat diferenţiate şi, respectiv, slab diferenţiate), selectate din cazuistica Serviciului de Anatomie Patologică şi Prosectură a Spitalului Clinic de Urgenţă Bucureşti. Investigaţia imunohistochimică a fost realizate utilizând anticorpii Ki-67 şi p53 (DAKO) şi metoda streptavidin-biotin (LSAB Kit, DAKO).

Analiza semicantitativă a reacţiilor imunohistochimice

Pentru aprecierea activităţii proliferative, indexul de pozitivitate Ki-67 (indexul Ki-67) s-a calculat ca număr de celule pozitive raportat la 100 celule pozitive şi negative, pe câmpuri microscopice analizate cu obiectiv x 40 (17).

Similar, expresia p53 a fost cuantificată prin raportare la procentul de nuclei pozitivi, rezultând un index p53. Reacţia a fost considerată cu expresie scăzută când mai puţin de 20% din nuclei au fost coloraţi, cu expresie moderată când s-au colorat între 10-50% din nuclei şi cu expresie marcată când s-au colorat mai mult de 50% din nuclei (18).

În cadrul acestei cercetări s-a folosit pentru prelucrarea statistică a datelor programul STATISTICA, dedicat cercetării medicale. Pentru compararea valorilor medii a unui parametru corespunzător mai multor loturi de date am aplicat testul ANOVA.

TABELUL I

Profilul imunohistochimic al cazurilor de adenocarcinom colonic studiate

Caz	Diagnostic histopatologic	Index Ki-67	Index p53
1	ADK bine diferenţiat	94%	22%
2	ADK bine diferenţiat	72%	50%
3	ADK bine diferenţiat	5%	95%
4	ADK bine diferenţiat	56%	70%
5	ADK bine diferenţiat	13%	76%
6	ADK moderat diferenţiat	5%	41%
7	ADK moderat diferenţiat	98%	negativ
8	ADK moderat diferenţiat	60%	34%
9	ADK moderat diferenţiat	85%	negativ
10	ADK moderat diferenţiat	45%	70%
11	ADK slab diferenţiat	95%	negativ
12	ADK slab diferenţiat	35%	100%
13	ADK slab diferenţiat	75%	negativ
14	ADK slab diferenţiat	15%	80%
15	ADK slab diferenţiat	84%	negativ

REZULTATE

1. Evaluarea semicantitativă a markerilor Ki-67 şi p53

Toate cazurile analizate au prezentat reacţie imunohistochimică pozitivă pentru Ki-67 (pozitivitate 100%), cu un index Ki-67 variind pe o scală foarte largă, între 5-95% (fig. 1, 2, 3). Din cele 15 cazuri, 10 au prezentat reacţie imunohistochimică pozitivă pentru p53 (pozitivitate 66%), cu un index p53 cuprins între 22-95% (fig. 4, 5), iar 5 cazuri au fost negative (fig. 6).

Valorile individuale pe caz pentru indexul Ki-67 şi indexul p53 sunt prezentate în tabelul I.

2. Analiza statistică a valorilor markerilor Ki-67 şi p53 în raport de gradul de diferenţiere

Indicatorii statistici ai cazurilor studiate, grupate pe subtipuri histologice de diferenţiere (adenocarcinom bine diferenţiat, moderat diferenţiat şi, respectiv, slab diferenţiat), sunt prezentaţi în tabelele II, III şi IV. Deoarece lotul de studiu a fost format dintr-un număr mic de cazuri, eroarea standard de estimare obţinută iniţial în cazul markerului p53 fiind foarte mare (9,7% – tab. III), a fost necesară normalizarea datelor (seriei de valori) (tab. IV).

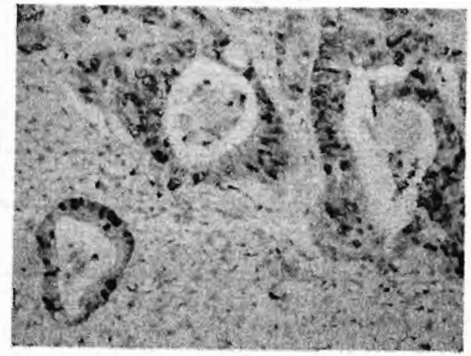


Fig. 1. Adenocarcinom bine diferenţiat – colon, reacţie pozitivă pentru Ki-67, index Ki-67 94% (IHC, Ac. anti-Ki-67, x10)

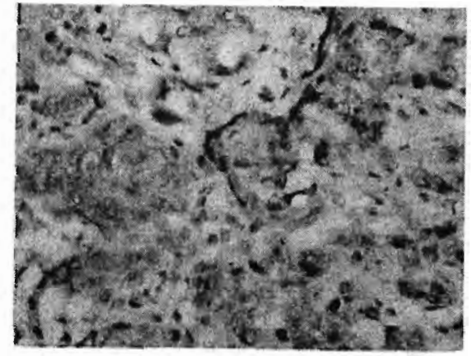


Fig. 2. Adenocarcinom moderat diferenţiat – colon, reacţie pozitivă pentru Ki-67, index Ki-67 5% (IHC, Ac. anti-Ki-67, x20)

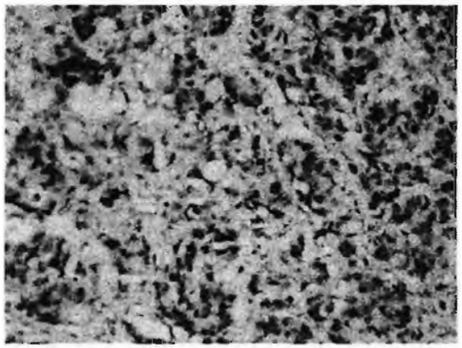


Fig. 3. Adenocarcinom slab diferenţiat - colon, reacţie pozitivă pentru Ki-67, index Ki-67 35% (IHC, Ac. anti-Ki-67, x10)

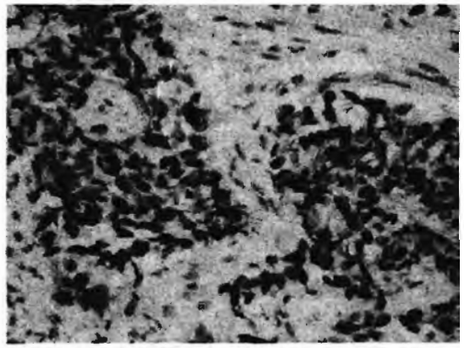


Fig. 4. Adenocarcinom slab diferenţiat - colon, reacţie pozitivă pentru p53, index p53 95% (IHC, Ac. anti-p53, x10)

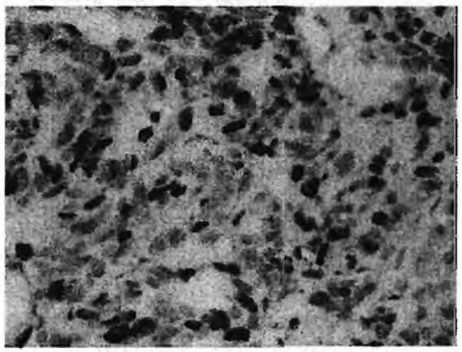


Fig. 5. Adenocarcinom moderat diferenţiat - colon, reacţie pozitivă pentru p53, detaliu pentru pozitivitatea nucleilor tumorali, index p53 40% (IHC, Ac. anti-p53, x20)

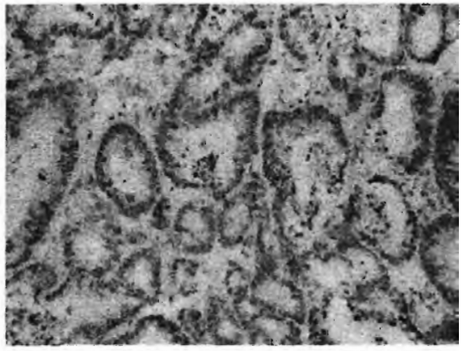


Fig. 6. Adenocarcinom bine diferenţiat - colon, reacţie negativă pentru p53 (IHC, Ac. anti-p53, x10)

TABELUL II

Indicatorii statistici ai Ki-67 în funcţie de gradul de diferenţiere a adenocarcinomului colonic

Loturi	Media p53	Media		Dev.std	Er. std	Min	Max
ADK bine diferenţiat	48.0%	31.6%	64.4%	35.0%	7.8%	5.0%	94.0%
ADK moderat diferenţiat	58.6%	43.0%	74.2%	33.4%	7.5%	5.0%	98.0%
ADK slab diferenţiat	60.8%	46.1%	75.5%	31.4%	7.0%	15.0%	95.0%
Total	**55.8%**	**47.2%**	**64.4%**	**33.2%**	**4.3%**	**5.0%**	**98.0%**

TABELUL III

Indicatorii statistici ai p53 în funcţie de gradul de diferenţiere a adenocarcinomului colonic

Loturi	Media p53	Media		Dev.std	Er. std	Min	Max
		-95%	+95%				
ADK bine diferenţiat	62.6%	28.1%	97.1%	27.8%	12.4%	22.0%	95.0%
ADK moderat diferenţiat	29.0%	-7.9%	65.9%	29.7%	13.3%	0.0%	70.0%
ADK slab diferenţiat	36.0%	-25.8%	97.8%	49.8%	22.3%	0.0%	100.0%
Total	**42.5%**	**21.8%**	**63.3%**	**37.5%**	**9.7%**	**0.0%**	**100.0%**

TABELUL IV

Indicatorii statistici ai p53 în funcţie de gradul de diferenţiere a adenocarcinomului colonic (normalizarea seriei de valori)

Loturi	Media p53	Media		Dev.std	Er. std	Min	Max
		-95%	+95%				
ADK bine diferenţiat	62.6%	50.7%	74.5%	25.5%	5.7%	22.0%	95.0%
ADK moderat diferenţiat	29.0%	16.2%	41.8%	27.3%	6.1%	0.0%	70.0%
ADK slab diferenitat	36.0%	14.6%	57.4%	45.7%	10.2%	0.0%	100.0%
Total	**42.5%**	**33.1%**	**52.0%**	**36.5%**	**4.7%**	**0.0%**	**100.0%**

Testul ANOVA pentru compararea valorilor medii ale Ki-67 a relevat faptul că nu există diferenţe semnificativ statistice între valorile medii ale Ki-67 şi subtipurile histologice (F (95% interval de confidenţă) = 0,399911, p = 0,674285). Testul ANOVA pentru compararea valorilor medii ale p53, consecutiv normalizării seriei de valori, a evidenţiat existenţa unei diferenţe semnificativ statistice între valorile medii ale p53 şi subtipurile histologice (F (95% interval de confidenţă) = 5,413838, p = 0,007036).

DISCUŢII

Evaluarea prognosticului cancerul de colon se realizează în raport de patru categorii de factori stabiliţi prin College of American Pathologists Consensus Statement 1999 (11). În categoria I sunt incluşi: extensia locală a tumorii evaluată sub raport patologic, metastazele îm limfoganglionii regionali, invazia în vasele sanguine şi limfatice, clasificarea tumorii reziduale şi creşterea nivelului CEA preoperator. Din categoria II fac parte: gradul histologic, marginile radiale, clasificarea tumorală după terapia neoadjuvantă, tipul histologic, trăsăturile histologice asociate cu MSI-H, pierderea heterozigozităţii pentru 18q si pierderea alelelor în genele cancerului de colon, configuraţia marginii tumorale. Factorii grupaţi în categoria III sunt: conţinutul în ADN, alţi markeri moleculari, invazia perineurală, densitatea microvasculară, proteine şi carbohidraţi celulari, fibroza peritumorală, reacţia inflamatorie peritumorală purulentă, focarele de diferenţiere neuroendocrină prezente în orice tip histologic, organizatorii nucleolari, indicii de proliferare. Categoria IV este reprezentată de dimensiunea tumorală şi configuraţia macroscopică a tumorii.

În carcinogeneza colorectală, una dintre direcţiile recente de cercetăre este orientată asupra evaluării relaţiei dintre proliferarea celulară şi apoptoză, obiectivată prin intermediul markerilor Ki-67, p53 şi bcl-2 (18, 19,20). Mecanismul patogenic implică o perturbare a balanţei normal stabilite între aceste două procese, ambele fiind crescute, dar proliferarea manifestându-se în exces (21). Consecutiv, supraexpresia proteinei p53 sugerează activarea proliferării şi limitarea apoptozei.

Anticorpul monoclonal Ki67 recunoaşte un antigen nuclear exprimat în fazele Gl, S, G2 şi M ale ciclului celular dar absent în faza G0 (de repaus) (22). În mucoasa colonică normală, celulele Ki67 pozitive se găsesc în mijlocul (zona de maturaţie) şi treimea inferioară (zona de proliferare) a criptelor intestinale; procentajul nucleilor coloraţi pozitiv în zonele proliferative şi de maturaţie sunt de 22,7% şi respectiv 17,8% (23). Imunoreactivitatea specifică este asociată cu proliferarea tumorală, indexul de proliferare Ki-67 având semnificaţie prognostică în nu numai pentru localizarea colonică, ci şi pentru alte tipuri de carcinoame (24).

Valorile medii ale indexului Ki-67 pentru serii de cazuri investigate imunohistochimic acoperă o scală foarte largă: peste 25% (20,25), 38% (26,27), 48,8% (28),

50% (29), 66,3 (30). Conform literaturii, Ki-67 nu se corelează cu parametrii clinici şi patologici care definesc carcinomul colonic (localizarea leziunii, vârsta, sexul, supravieţuirea la 5 ani, gradul de diferenţiere), existând însă o corelaţie puternică, semnificativ statistic, cu dezvoltarea metastazelor (31). Din acest motiv, Ki-67 are o utilizare limitată ca factor de prognostic discriminant (23). Rezultatele obţinute pe lotul nostru de studiu s-au caracterizat printr-o pozitivitate în procent de 100% a reacţiei pentru Ki-67, valoarea medie de 55,8% a indexul Ki-67 conducând la o poziţionare spre limita superioară a scalei raportate în fluxul principal de publicaţii. Deşi valorile medii ale indexului Ki-67 pentru fiecare grup corespondent unui subtip histologic au fost diferite şi relativ distanţate (48% în adenocarcinomul bine diferenţiat, 58,6% în adenocarcinomul moderat diferenţiat şi 60,6% în adenocarcinomul slab diferenţiat), analiza statistică nu a stabilit existenţa unei corelaţii cu semnificaţie statistică între activitatea proliferativă şi gradul de diferenţiere. Indexul Ki-67 îşi menţine valoarea în raport cu procesul de metastazare şi poate recomanda o indicaţie pentru radioterapia post-chirurgicală, cu răspuns pozitiv asupra celulelor cu ritm rapid de diviziune (24).

Studiile imunohistochimice au demonstrat supraexpresia proteinei p53 în diferite tipuri de neoplazii, în carcinoamele colorectale mutaţia p53 apărând relativ târziu în progresia tumorală şi fiind corelată cu creşterea agresivităţii (32). Valorile raportate pentru carcinoamele colonice p53 pozitive se înscriu într-un interval larg: 17% (33), 42% (25,34,35,36), 57% (37), 60% (38,39), 65% (40), 67,3% (27,41,42), 77% (29), 80% (43). Datele rezultate din interpretările analizei statistice au demonstrat că p53 nu se corelează cu gradul de diferenţiere (36,40,41), extensia tumorii sau indexul de proliferare (41). În lotul studiat, 66% din cazuri au fost 53 pozitive, cu un index p53 mediu de 42,5%, rezultat din valorile 62,6% pentru subtipul adenocarcinom bine diferenţiat, 29,0% pentru subtipul adenocarcinom moderat diferenţiat şi, respectiv, 36,0% pentru subtipul adenocarcinom slab diferenţiat. Urmare a normalizării seriei de valori individuale, impusă datorită numărului mic de cazuri din fiecare grup, cu repercutare directă asupra deviaţiei standard, am obţinut o corelaţie cu semnificaţie statistică între p53 şi gradul de diferenţiere. Acest rezultat, diferit de raportările din literatura de specialitate, ne obligă implicit la aprofundarea investigaţiilor asupra markerului p53, în vederea confirmării pe un număr mai mare de cazuri a corelaţiei obţinute în prezentul studiu.

CONCLUZII

Absenţa unei implementări la nivel naţional a screening-ului pentru carcinomul colorectal rezultă în stabilirea frecventă, în practica curentă, a diagnosticul în stadii avansate. Cercetarea noastră accentuează valoarea examenului imunohistochimic în patologia tumorală colorectală, prin raportarea markerilor Ki-67 şi p53 la gradul de diferenţiere tumorală. Ansamblul datelor obţinute în investigaţia realizată - necorelarea Ki-67 şi, respectiv, corelarea p53 cu subtipurile histopatologice de adenocarcinom - deschide perspective viabile pentru o ierarhizare obiectivă a valorii diferiţilor markerilor imunohistochimici în strategia de diagnostic.

BIBLIOGRAFIE

1. Fearon ER, Volgelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

2. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin N Am* 2002; 16: 775-810.
3. Hamilton SR, Rubio CA, Volgelstein B. Tumours of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA (eds.) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*, IARC Press, Lyon, 2000, 103-145.
4. Baker D. Current surgical management of colorectal cancer. *Nurs Clin N Am* 2001; 36 (3): 579-592.
5. Jessup JM, McGinnis LS, Steele GD Jr, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base. Report on colon cancer. *Cancer* 1996; 78 (4): 918-926.
6. Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, Madenis N, Ganazzi D, Cassinadri MT, Lauriola P, Ponz de Leon M. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer* 1996; 32A (2): 295-302.
7. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Intratumoral molecular or genetic markers as predictors of clinical outcome with chemotherapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2005; 32: 120-127.
8. Minsky BD. Adjuvant therapy for rectal cancer: Results and controversies. *Oncol* 1998; 12: 1129-1139.
9. D'Eredita G, Serio G, Neri V, Polizzi RA, Barberio G, Losacco T. A survival regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer. *Aust N Z J Surg* 1996; 66 (7): 445-451.
10. Ropponen K, Eskelinen M, Kosma VM, Lipponen P, Paakkinen P, Alhava E. Comparison of classic and quantitative prognostic factors in colorectal cancer. *Anticancer Res* 1996; 16 (6B): 3875-3882.
11. Compton CC, Fielding PL, Burgart LJ et al. Prognostic factors in colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 979-994.
12. Farhoud S, Bromberg SH, Barreto E, Godoy AC. Clinical and macroscopic variables that influence the prognosis of colorectal carcinoma. *Arq Gastroenterol* 2002; 39 (3): 163-172.
13. Adachi Y, Yasuda K, Kakisako K, Sato K, Shiraishi N, Kitano S. Histopathologic criteria for local excision of colorectal cancer: multivariate analysis. *Ann Surg Oncol* 1999; 64 (4): 385-388.
14. Guerra A, Borda F, Javier Jiménez F, Martinez-Peñuela JM, Larrínaga B. Multivariate analysis of prognostic factors in resected colorectal cancer: a new prognostic index. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10 (1): 51-58.
15. Baldus SE. Clinical, pathological and molecular prognostic factors in colorectal carcinomas. *Pathologe* 2003; 24 (1): 49-60.
16. Menon AG, Janssen van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar R, JHvan de Velde C, Fleuren GJ, Kuppen PJK. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 2004; 84: 493.
17. Hui A-M, Shi Y-Z, Li X, Sun L, Guido T, Takayama T, Makuuchi M. Proliferative marker Ki-67 in gallbladder carcinomas: high expression level predicts early recurrence after surgical resection. *Cancer Lett* 2002; 176: 191-198.
18. Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Epithelial neoplasms of the appendix and colorectum: an analysis of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53, CD44, bcl-2. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126 (7): 837-841.
19. Song SY, Lee SK, Kim DH, Son HJ, Kim HJ, Lim YJ, Lee WY, Chun HK, Rhee JC. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. *Dig Dis Sci* 2002; 47 (8): 1831-1835.
20. Zavrides H, Zizi-Sermpetzoglou A, Elemenoglou I, Papatheofanis I, Peros G, Athanasas G, Panousopoulos D. Immunohistochemical expression of bcl-2 in Dukes' stage B and C colorectal carcinoma patients: correlation with p53 and ki-67 in evaluating prognostic significance. *Pol J Pathol* 2005; 56 (4): 179-185.
21. Hao X, Du M, Bishop AE, Talbot IC. Imbalance between proliferation and apoptosis in the development of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 1998; 433 (6): 523-527.
22. Akedo I, Ishikawa H, Ioka T, Kaji I, Narahara H, Ishiguro S, Suzuki T, Otani T. Evaluation of epithelial cell proliferation rate in normal-appearing colonic mucosa as a high-risk marker for colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10 (9): 925-930.
23. Kyzer S, Gordon PH. Determination of proliferative activity in colorectal carcinoma using monoclonal antibody Ki67. *Dis Colon Rectum* 1997; 40 (3): 322-325.

24. Salminen E, Palmu S, Vahlberg T, Roberts PJ, Söderström KO. Increased proliferation activity measured by immunoreactive Ki67 is associated with survival improvement in rectal/recto sigmoid cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (21): 3245-3249.
25. Baretton GB, Diebold J, Christoforis G et al. Apoptosis and immunohistochemical bcl-2 expression in colorectal adenomas and carcinomas. Aspects of carcinogenesis and prognostic significance. *Cancer* 1996; 77 (2): 255-264.
26. Suzuki H, Matsumoto K, Terabe M. Ki-67 antibody labeling index in colorectal carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15 (4): 317-320.
27. Saleh HA, Aburashed A, Bober P, Tabaczka P. P53 protein immunohistochemical expression in colonic adenomas with and without associated carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1998; 93 (6): 980-984.
28. Berenzi A, Benetti A, Bertalot G, Rodolfi A, Portolani N, Giulini SM, Pulcini G, Vinco A, Tiberio G. Ki67 immunohistochemical evaluation in colorectal cancer and normal colonic mucosa. Possible clinical applications. *Pathologica* 1992; 84 (1090): 155-163.
29. Kikuchi Y, Dinjens WN, Bosman FT. Proliferation and apoptosis in proliferative lesions of the colon and rectum. *Virchows Arch* 1997; 431 (2): 111-117.
30. Johnston PG, O'Brien MJ, Dervan PA, Carney DN. Immunohistochemical analysis of cell kinetic parameters in colonic adenocarcinomas, adenomas, and normal mucosa. *Hum Pathol* 1989; 20 (7): 696-700.
31. Aoki R, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F, Kohno N. MUC-1 expression as a predictor of the curative endoscopic treatment of submucosally invasive colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1998; 41 (10): 1262-1272.
32. Nathanson SD, Linden MD, Tender P, Zarbo RJ, Jacobsen G, Nelson LT. Relationship among p53, stage, and prognosis of large bowel cancer. *Dis Colon Rectum* 1994; 37 (6): 527-534.
33. Hayashi Y, Widjono YW, Ohta K, Hanioka K, Obayashi C, Itoh K, Imai Y, Itoh H. Expression of EGF, EGF-receptor, p53, v-erb B and ras p21 in colorectal neoplasms by immunostaining paraffin-embedded tissues. *Pathol Int* 1994; 44 (2): 124-130.
34. Hao XP, Ilyas M, Talbot IC. Expression of Bcl-2 and p53 in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Pathobiology* 1997; 65 (3): 140-145.
35. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulias V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 86 (8): 1421-1430.
36. Carneiro FP, Ramalho LN, Britto-Garcia S, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of p16, p53, and p63 in colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Dis Colon Rectum* 2006; 49 (5): 588-594.
37. Goussia AC, Ioachim E, Agnantis NJ, Mahera M, Tsianos EV. Bcl-2 expression in colorectal tumours. Correlation with p53, mdm-2, Rb proteins and proliferation indices. *Histol Histopathol* 2000; 15 (3): 667-672.
38. Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T. Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clin Pathol* 1992; 97 (2): 244-249.
39. Kanavaros P, Stefanaki K, Valassiadou K, Vlachonikolis J, Mavromanolakis M, Vlychou M, Kakolyris S, Gorgoulis V, Tzardi M, Georgoulias V. Expression of p53, p21/waf, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in colorectal adenocarcinomas. *Med Oncol* 1999; 16 (1): 23-30.
40. Darmon E, Cleary KR, Wargovich MJ. Immunohistochemical analysis of p53 overexpression in human colonic tumors. *Cancer Detect Prev* 1994; 18 (3): 187-195.
41. Campo E, de la Calle-Martin O, Miquel R, Palacin A, Romero M, Fabregat V, Vives J, Cardesa A, Yague J. Loss of heterozygosity of p53 gene and p53 protein expression in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51 (16): 4436-4442.
42. Gallego MG, Aceñero MJ, Ortega S, Delgado AA, Cantero JL. Prognostic influence of p53 nuclear overexpression in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2000; 43 (7): 971-975.
43. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Vogt U, Wegmann W. p53 protein expression in colo-rectal adenomas: an immunohistochemical study using an antigen retrieval system. *Histopathol* 1995; 27 (6): 517-523.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

LIMFOMUL GASTRIC STUDIU MORFOLOGIC ŞI IMUNOHISTOCHIMIC

D. Ferariu[1], M. Danciu[2], Delia Ciobanu[2], Niculina Florea[1], V. Scripcariu[3], Maria Sultana Mihailovici[2]
Spitalul Clinic de Urgenţă "Sf. Spiridon" Iaşi
1 Serviciul de Anatomie Patologică şi Prosectură
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
2 Disciplina de Morfopatologie
3 Clinica a III-a Chirurgie

GASTRIC LYMPHOMA. MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY (Abstract): Most of extranodal lymphomas are localized in gastrointestinal tract, gastric lymphoma representing more than 50% of them. The role that *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) plays in pathogenesis of gastric lymphoma has changed the therapeutic approach. **Aims**: Description of morphological features and immunohistochemical pattern of gastric lymphomas from patients admitted in University Hospital "Sf. Spiridon" Iaşi. **Material and methods**: Thirtyfour gastric lymphomas were investigated using routine histopathological technics and immunohistochemical staining based on a large panel of antibodies: CD3, CD5, CD20, CD79á, CD23, CD30, cyclin-D1, BCL2, BCL6, ALK1, Ki67, CK-cocktail, anti-*H. pylori*. **Results**: All gastric lymphomas were localized in the antrum, most of them being solitary and large-sized tumors. Ninety-seven percent were B-cell lymphomas, 41.17% were mucosa-associated lymphatic tissue lymphomas (MALT lymphomas), and the remaining were high grade lymphomas. Only one case was classified as peripheral T-cell lymphoma. Citokeratin cocktail immunostaining improved the detection of typical lymphoepithelial lesions, which characterized exclusively the MALT lymphomas. The sensibility for *H. pylori* detection in gastric lymphoma cases was increased by 22% using anti-*H. pylori* antibodies. **Conclusions**: Immunohistochemistry is a diagnostic method for gastric lymphomas, being useful in identification of lymphoepithelial lesions, detection of *H. pylori* infection, and is mandatory for lymphomas classification according to WHO criteria. **Key words**: GASTRIC LYMPHOMA, LYMPHOEPITHELIAL LESIONS, ANTI-H. PYLORI ANTIBODIES

În anul 1983, Isaacson (1) descrie pentru prima dată limfoamele ţesutului limfoid asociat mucoaselor (MALT), pornind de la unele similitudini morfologice între acestea şi ţesutul limfoid asociat mucoaselor. Autorul izolează din marea masă a limfoamelor o nouă entitate caracterizată de aspecte morfologice distincte şi un comportament clinic particular.

Tratatele clasice de patologie considerau că limfoamele extraganglionare sunt rare, acestea fiind privite ca variante ale limfoamelor primitive ganglionare. Studii epidemiologice realizate în ultimele decade au arătat că, de fapt, limfoamele extraganglionare reprezintă aproximativ 40% din totalul limfoamelor.

Majoritatea limfoamelor extraganglionare sunt localizate la nivelul tractului gastro-intestinal, limfoamele gastrice (LG) reprezentând peste jumătate dintre acestea, deşi stomacul este un organ relativ mic şi,

în mod normal, lipsit de ţesut limfoid.

Incidenţa ridicată a LG a determinat concentrarea eforturilor de descoperire şi înţelegere a mecanismelor care stau la baza apariţiei limfomului în acest teritoriu.

În ultimii ani au fost realizaţi paşi importanţi în descifrarea etiopatogeniei LG, un rol central fiind atribuit infecţiei cu *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (2). Acest aspect a permis elaborarea de noi mijloace de tratament antitumoral ce vizează în primul rând eradicarea infecţiei cu *H. pylori*.

În România sunt date reduse privind atât aspectele epidemiologice cât şi cele morfologice ale limfomului gastric.

Studiul şi-a propus realizarea unei analize complexe, în vederea caracterizării prin mijloace morfologice clasice şi prin metode imunohistochimice, a LG din cazuistica Spitalului Clinic de Urgenţă "Sf. Spiridon" Iaşi.

MATERIAL ŞI METODĂ

Lotul de studiu a inclus 34 de pacienţi cu diagnostic histopatologic de limfom gastric primitiv. Materialul biologic a provenit de la pacienţii operaţi în clinicile Chirurgie I şi III ale Spitalului Clinic de Urgenţă "Sf. Spiridon" Iaşi, în perioada 1 ianuarie 2000 - 31 decembrie 2006.

În prima parte a studiului au fost abordate metode histopatologice curente, fiind investigată o serie de caractere morfologice clasice precum colonizarea foliculară, diferenţierea plasmocitară, leziunile limfoepiteliale şi infecţia cu *H. pylori*. Studiul imunohistochimic, realizat în partea a doua a cercetării, a fost necesar pentru clasificarea după criterii OMS a LG, precum şi pentru reevaluarea leziunilor limfoepiteliale şi a infecţiei cu *H. pylori*. Marcajele imunohistochimice au fost realizate prin tehnica *avidin-biotin complex*, pe blocuri multitisulare, utilizând reactivi de provenienţă Dako (CD3, CD5, CD20, CD79á, CD23, CD30, cyclin-D1, BCL2, BCL6, ALK1, Ki67, CK-cocktail, anti-*H. pylori*). Blocurile multitisulare au fost confecţionate manual.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din punct de vedere macroscopic, au fost descrise două cazuri cu tumori multiple, în celelalte cazuri fiind vorba de tumori unice (94%), cu localizare de predilecţie antrală. Dimensiunile tumorilor au variat între 4/3 şi 13/10 cm, suprafaţa medie fiind 49,22 cm^2, mai mare în cazul tumorilor complicate (60 cm^2). Un singur caz a prezentat tumoră localizată strict la mucoasă şi submucoasă (limfom gastric superficial), celelalte fiind forme exofitice (8 cazuri), infiltrative (6 cazuri) sau mixte (19 cazuri).

Comparativ cu ţările vestice, în care metodele de screening conduc la identificarea tumorilor gastrice în stadii precoce (3), se remarcă faptul că marea majoritate a cazuisticii noastre este compusă din tumori de mari dimensiuni.

După criterii histopatologice clasice, LG din cazuistica noastră au fost împărţite în 3 categorii: limfoame cu celule mici (14 cazuri, 41,17%), limfoame cu celule mari (18 cazuri, 52,94%) şi limfoame mixte (2 cazuri, 5,8%). Limfoamele mixte au prezentat o componentă minoritară cu celulă mică, sugerând transformarea unui limfom cu grad scăzut într-un limfom agresiv.

Limfoamele cu celule mici au fost relativ omogene morfologic, fiind constituite predominant din celule de tip centrocitic, aspectul monocitoid fiind întâlnit doar în două cazuri. Limfoamele cu celule mari au fost heterogene, fiind descrise variante imunoblastice, centroblastice, mixte, un singur caz prezentând un pleomorfism nuclear marcat cu celule multinucleate sau aspecte sternbergoide.

Aspecte de colonizare foliculară au fost descrise doar în limfoamele cu celule mici. Colonizarea de tip I, în care foliculii limfoizi erau infiltraţi în totalitate cu celule tumorale, mantaua foliculară fiind atenuată, a fost întâlnită în două cazuri. Colonizarea

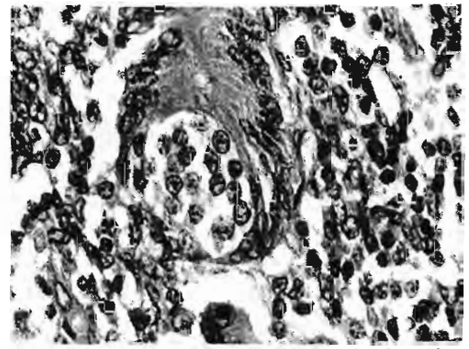


Fig. 1. Leziune limfoepitelială, HE, ob. x40

de tip II, cu marcată distensie a centrilor germinativi dar manta evidentă, a fost descrisă în două cazuri. Colonizarea de tip III, caracterizată de infiltrare cu plasmocite a centrilor germinativi, a fost descrisă într-un singur caz ce prezenta diferenţiere plasmocitară marcată.

Diferenţierea plasmocitară a fost întâlnită în limfoamele cu celule mici (5 cazuri, 35%) şi într-un caz de limfom mixt ce a prezentat diferenţiere plasmocitară în componenta cu celule mici.

Colonizarea foliculară şi diferenţierea plasmocitară au fost descrise în proporţii similare altor studii (4), fiind practic identice cu studiul original al lui Isaacson (1), care descrie pentru prima dată limfoamele gastrice. Identificarea leziunilor limfoepiteliale a constituit o parte importantă a studiului, prezenţa acestora fiind evocatoare pentru limfoamele MALT (5). Pe coloraţia de rutină, leziuni limfoepiteliale tipice au fost prezente în 6 limfoame cu celule mici (42% dintre acestea) (fig. 1).

Diseminarea ganglionară a fost identificată în 63% dintre cazuri, fiind mai frecventă în limfoamele cu celule mari (83%) faţă de limfoamele cu celule mici (43%). Ambele cazuri de limfom mixt au prezentat diseminare ganglionară prin componenta agresivă.

Nivelul de infiltrare parietală este, alături de diseminarea ganglionară, un criteriu foarte important utilizat la clasificarea stadială a limfomului gastric. Un singur caz a prezentat infiltrare tumorală limitată la mucoasă şi submucoasă, în marea majoritate a cazurilor (79,41%) infiltrarea parietală fiind până la nivelul seroasei. Perforaţia gastrică a fost întâlnită în 3 cazuri de limfom cu celule mari.

Încadrarea stadială s-a făcut după criteriile clasificării Ann Arbor pentru limfoamele extraganglionare, clasificare adaptată de Musshof (6) pentru limfoamele gastrointestinale. Clasificarea are la baza gradul de infiltrare parietală şi diseminarea ganglionară, rezultatele fiind prezentate în tabelul I.

Datele din tabelul I arată că 67,64% din cazuri au prezentat o formă avansată local

TABELUL I

Stadializarea limfoamelor gastrice după clasificarea Ann Arbor pentru limfoamele extraganglionare, modificată de Musshoff

Stadiu	Criterii	Nr. cazuri
EI	**Limfom limitat la peretele gastric**	
EI1	Limfom localizat la mucoasă şi submucoasă	1
EI2	Limfom extins la musculară	10
EII	**Limfom cu determinari ganglionare**	
EII1	Limfom cu determinări ganglionare regionale	17
EII2	Limfom cu determinări ganglionare dincolo de ganglionii regionali, dar de aceeaşi parte a diafragmului	1
EIII	**Limfom cu infiltrarea altor segmente digestive sau cu determinări ganglionare la distanţă**	5
EIV	**Limfom cu determinări ganglionare regionale şi diseminare difuză în afara tractului gastrointestinal**	-

sau cu determinări secundare la distanţă. Nu am întâlnit diferenţe semnificative privind tipul celular şi stadiul clinic.

Studiul imunohistochimic a fost realizat pe blocuri multitisulare, având drept scop clasificarea după criterii moderne, impuse de OMS (7), a limfoamelor gastrice incluse în cazuistică. În urma marcajelor imunohistochimice, cele 34 de limfoame gastrice au fost clasificate asfel:

- 18 limfoame cu celule mari B;
- 14 limfoame MALT (limfoame cu celule din zona marginală);
- 2 limfoame cu celule mari B cu componentă MALT minoritară (limfoame mixte);
- 1 limfom cu celule T periferice.

Prezenţa leziunilor limfoepiteliale a fost reevaluată prin marcaj cu pan-citokeratine. Au fost identificate leziuni limfoepiteliale tipice în 9 limfoame MALT (fig. 2) şi un limfom mixt. Leziuni limfoepiteliale distructive au fost decelate în 2 limfoame cu celule mari B.

Identificarea leziunilor limfoepiteliale constituie o etapa obligatorie a diagnosticului limfoamelor gastrointestinale. Deşi este subliniată importanţa leziunilor limfoepiteliale în limfoamele MALT, literatura nu menţionează proporţia limfoamelor MALT cu leziuni prezente. Trebuie subliniat că absenţa leziunilor limfoepiteliale nu neagă posibilitatea unui limfom MALT.

Limfoamele agresive au prezentat doar

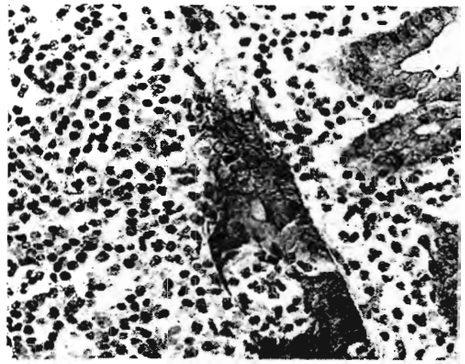


Fig. 2. Leziune limfoepitelială, CK-cocktail, ob. x20

leziuni cu caracter distructiv glandular. Lipsa unui caracter definitoriu pentru limfoamele MALT justifică excluderea limfoamelor cu celule mari din această categorie, termenul de limfom cu celule mari de tip MALT fiind astăzi repudiat (7).

Infecţia cu *H. pylori* a fost identificată pe coloraţia Giemsa doar în 7 cazuri, 5 limfoame MALT (35%) (fig. 3) şi două limfoame cu celule mari B (10%). Datele din literatură menţionează valori variate ale incidenţei infecţiei, mergând până la 90% în limfoamele MALT (9). Deoarece testele neinvazive de detectare a infecţiei cu *H. pylori* nu au fost făcute preoperator, am considerat utilă marcarea imunohistochimică a *H. pylori*.

În urma marcajului imunohistochimic

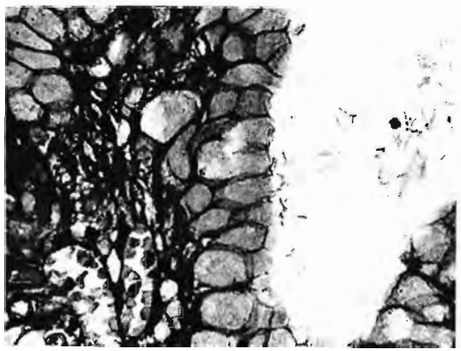


Fig. 3. *H. pylori*, Giemsa, ob. x40

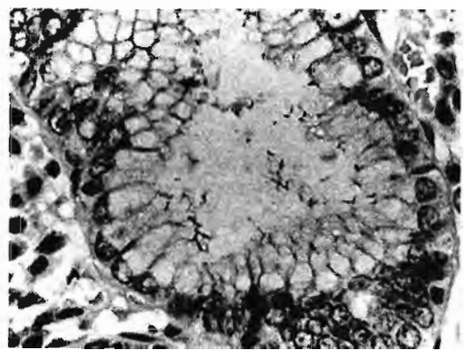


Fig. 4. *H. pylori*, anti-*H. pylori*, ob x40

anti-*H. pylori* am identificat în total 11 cazuri pozitive, dintre care 8 limfoame MALT (57,7%) (fig. 4), două limfoame cu celule mari B (15%) şi un caz de limfom mixt. Imunohistochimia a crescut semnificativ numărul cazurilor pozitive, în special pentru limfoamele MALT. Cazurile nou descoperite prezentau o colonizare redusă, focală, ce nu a putut fi observată pe coloraţia Giemsa.

Aceste rezultate confirmă utilitatea marcajului imunohistochimic anti-*H. pylori*, sugerând utilizarea lui de rutină, mai ales în cazurile negative la coloraţia standard.

CONCLUZII

Limfoamele gastrice au fost localizate cel mai frecvent în regiunea antrală, 94% dintre tumori fiind unice şi de dimensiuni mari. Profilul imunohistochimic al LG arată că 97% au fost limfoame cu celule B, din care 58,83% au fost limfoame cu morfologie agresivă (LG cu celule mari B şi LG cu celule periferice T), restul (41,17%) fiind limfoame MALT. Leziuni limfoepiteliale tipice au fost întâlnite doar în limfoamele de zonă marginală (64%), marcajul cu CK-cocktail facilitând identificarea acestora. Lipsa leziunilor limfoepiteliale tipice în limfoamele agresive susţine excluderea acestora din categoria limfoamelor MALT. Marcarea imunohistochimică a crescut cu 22% sensibilitatea detectării infecţiei cu *H. pylori*, recomandând această metodă în cazurile negative pe coloraţia Giemsa. Proporţia mare a limfoamelor gastrice cu infiltrare parietală totală sau cu diseminare ganglionară (67,64%), în concordanţă cu dimensiunile mari ale tumorilor, indică un diagnostic clinic tardiv şi susţin necesitatea implementării screeningului pentru detectarea precoce a leziunilor tumorale gastrice.

BIBLIOGRAFIE

1. Isaacson PG, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983; 52: 1410-1416.
2. Stolte MF, Bayerdorffer E, Morgner AF. Helicobacter and gastric MALT lymphoma. *Gut* 2002; 50(suppl 3): III19-24.
3. Ullrich A, Fischbach W, Blettner W. Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Ann Oncology* 2002; 13: 1120-27.
4. Isaacson PG, Weterspoon AC, Dis T, Pan L. Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-asociated lymphoid tissue. *Am Surj Pathol* 1991; 15: 819-829.
5. Du MQ, Isaccson PG. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *Lancet Oncol* 2002; 3: 97-104.
6. Ahmad A, Govil Y, Frank B. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroent* 2003; 98(3): 975-85.
7. Jaffe ES, Lee Harris N, Stein H, Vardiman JW. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press, 2001.
8. Du M-Q, Atherton AJ. Molecular subtyping of gastric MALT lymphoma: implication for prognosis and management. *Gut* 2006; 55: 886-893.
9. Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H et al. Clinicopatological features of gastric-asociated lympoyd tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-asociated lympoyd tissue lymphoma component. *J Gatroenterol Hepatol* 2002; 17(2): 226-227.

FLOW CYTOMETRY-BASED QUANTIFICATION OF CYTOKINE LEVELS IN AML PATIENTS PLASMA AND CELL CULTURE SUPERNATANTS

Angela Dăscălescu[1], Mihaela Zlei [2], Carmen Aanei[1], Didona Ungureanu[1], Maria Ţepeluş[2], Cristina Burcoveanu[1], C. Dănăilă[1]
"Gr.T. Popa" University of Medicine and Pharmacy Iaşi
School of Medicine
1 Department of Hematology
"Sf. Spiridon" University Hospital Iaşi
2 Tumor Immunology Laboratory

FLOW CYTOMETRY-BASED QUANTICATION OF CYTOKINE LEVELS IN ACUTE MYELOBLASTIC LEUKEMIA (AML) PATIENTS PLASMA AND CELL CULTURE SUPERNATANTS (Abstract): **Aim**: Bone marrow stromal cells (BMSCs) have been found to support leukemic cell survival; however, the mechanisms responsible are far from being elucidated yet. The main aim of the current study is to identify particular cytokine/chemokine patterns of acute myeloid leukemia (AML) cells, and, on a longer term, to correlate them with the patient outcome and response to therapy. Therefore, the influence of BMSCs on *in vitro* modulation of cytokine secretion (IL-1β, TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-4, IL-5, and IL-2) by AML cells as well as the AML cells supportive capacity of BMSCs-derived soluble factors was investigated. MATERIAL AND METHODS: With this purpose, we used an *in vitro* experimental model consisting in the evaluation of the effect of BMSC confluent layers-conditioning medium (BMSC-CM) on M4/5 AML cell cultures. **Results**: Our results show that BMSC-CM from both AML patients and healthy subjects conferred a substantial beneficial effect on AML cells throughout the culture (p=0.0002 and 0.0020 respectively at 24 hours and p=0,0013 and 0,0030 respectively at 72 hours), with a temporary increase in AML cell viability conferred by BM plasma from AML patients. Significant differences were observed with respect to IL1 b secretion which was upregulated in AML cell cultures both after 24 and 72 hours following the addition of AML-BMSC-CM, in contrast to control-BMSC-CM. **Conclusion**: Our results suggest the contribution of BMSCs from AML patients to the generation of particular factors which may be key players involved in the *in vivo* maintenance of the malignant clone. **Key words**: BONE MARROW STROMAL CELLS, CYTOKINES, ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Cytokines form a network that regulates proliferation and differentiation in various hematopoietic compartments (1). Cytokines are important regulators of acute myelogenous leukemia (AML) blast proliferation. For a subset of patients the AML blasts show constitutive cytokine secretion and can undergo autonomous proliferation in vitro, whereas for other patients the blasts are dependent on exogenous cytokines for proliferation. The capability of autocrine proliferation is an adverse prognostic factor in AML. The three cytokines, interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-13 modulate in vitro blast proliferation, but the final effect of each cytokine (enhancement/inhibition/no effect) depends on differences between individual patients as well as the presence of

other exogenous cytokines (2).

In one study, they observed that a high proliferative response to IL-1 beta in the cells of AML patients may indicate a poor prognosis (3). These growth factors are additionally involved in the control of immune modulation (IL-10, TGF-β), tumor neovascularization (IL-15, IL-18, VEGF) as well as prevention of apoptosis of tumor cells and stimulation of cell proliferation (IL-7, IL-10, IL-15) via autocrine or paracrine pathways (4,5). In addition to stromal cells, malignant cells, mainly B chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells (6,7), leukemic blasts in acute myeloid leukemia (AML) (8) and lymphoma cells (9) have been shown to express a broad range of cytokines, i.e. IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, IL-15, IFN-γ, TNF-α, G-CSF, TGF-β1 and GM-CSF.

The hypothesis behind our project is that the origin of the leukemic defect may be clarified only through the understanding of the composition of the malignant microenvironment, its relationship with the pathogeny of the disease and how the host, "normal", non-leukemic cells interact with the leukemic ones.

Evaluation in comparative fashion of the interactions between primary AML cells from M4/5 AML patients with the tumor niches accessory cells and molecules may offer a basis for the identification of biological and clinical patterns of the tumor.

MATERIAL AND METHODS

BMSCs. BM aspirates from M4/5 AML patients (n=4) and healthy volunteers (n=3) were cultured at 37°C and 5% CO_2 in 75 cm^2 flasks (Nunc, Denmark) using RPMI medium (Sigma) and 10% Foetal bovine serum (FBS, Sigma). Confluent stroma layers were generated within 4 to 8 weeks. At the time of confluence, conditioning medium (BMSCS-CM) was collected, centrifuged and filtered and stroma cells were detached from the culture flasks using 0,25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (Sigma) and viably frozen for later use.

Primary AML cells. BM aspirates with around 90% leukemic cell infiltration were obtained from M4/5 AML patients at initial diagnosis (n =8). AML blast fraction was enriched in all samples, by density gradient centrifugation (Ficol, Sigma) according to manufacturer's instructions. $5x10^5$ AML cells/mL/well were cultured in 24-well plates; culture medium consisted of RPMI-1640 with 10% FBS (standard culture conditions) with or without 20% BMCS-CM or BM plasma from M4/5 AML patients/ healthy controls.

Measurement of cell viability. 24 and 72 hours following BMSC-CM or BM plasma addition AML percentages of viable AML cells were calculated by flow-cytometry (FACSCalibur machine, Becton Dickinson, CellQuest software), using a gating strategy on CD45 (monoclonal antibody anti-human CD45-FITC, BD), HLA/DR (monoclonal antibody anti-human HLA/DR-PE, BD) double positive/Propidium iodide (PI) negative cells. Control cultures consisted of confluent layers of BMSCs, on one hand, and of AML cell cultures without BMSC-CM or plasma (standard culture conditions), on the other, were comparatively assessed.

Measurement of cytokine production in the culture supernatant. The level of the following 7 cytokines was evaluated in the culture supernatant at both culture time points (24 and 72 hours): IL-1β (by ELISA, Quantikine, R&D Systems) and TNF-α, IL-10, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-2 (by flow cytometry, BD™ Cytometric, a FACS-based cytokine array kit using capture beads and fluorescent conjugated detection antibodies). 56 duplicated experiments were performed in total, representing co-cultures of AML cells with BMSC-CM or BM-plasma from AML patients or BMSC-CM from healthy controls.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The assessment of BMSC-CM on AML cell viability. The comparative analysis of AML cell viability in different culture conditions: standard (RPMI + 10% FBS), AML-BMSC-CM (20%), control-BMSC-CM (20%) and AML-BM-plasma (20%) has been carried out by calculation of propidium iodure (PI) negative (viable) cell fraction by flow cytometry (fig. 1). Although the patients inclusion into the study group was carried out on the criterion of more than 90% BM infiltration with AML cells, the mononuclear cell fraction separated by density gradient centrifugation also contained small proportions of lymphocytes and erythrocytes (fig.1).

Therefore, we consider the use of a gating strategy, which allowed us to focus the analysis of PI expression within the cell population of interest. As leukemic cells in M4/5 AML are heterogeneous with respect to their expression of particular markers (CD14, CD64, CD4, CD34, CD117), the interest gate was design to contain CD45 (intermediate expression) HLA/DR double positive cells. Of note, the proportion between the mention cell populations within the AML specimens was preserved during culture progress (fig. 1).

Soluble factors released by BMSC cultures from both AML patients (AML-BMSC-CM) and healthy subjects (control-BMSC-CM) conferred a significant higher viability to AML cells when compared to standard culture conditions, at both 24 h ($p=0.0002$ and 0.0020 respectively) and 72 hours ($p=0.0013$ and 0.0030 respectively) (fig. 2). At 72 hours, both types of BMSC-CM proved to have a superior supportive effect when compared to BM-AML-plasma ($p=0.0059$ and 0.007 respectively). There were no significant differences between AML-BMSC-CM and control-BMSC-CM at either time point assessed. Bone marrow plasma from AML patients (AML-BM-plasma) had a significant supportive effect only in the first 24 hours ($p=0.0056$). The limited efficiency of BM plasma from AML patients in preserving AML cell viability reflects a stroma-dependent phenomenon, which are specific to the BM microenvironment. This context suggests *in vivo* events.

Assessment of the cytokine profile within BM plasma of AML patients. Recently developed human cytokine array kits combine

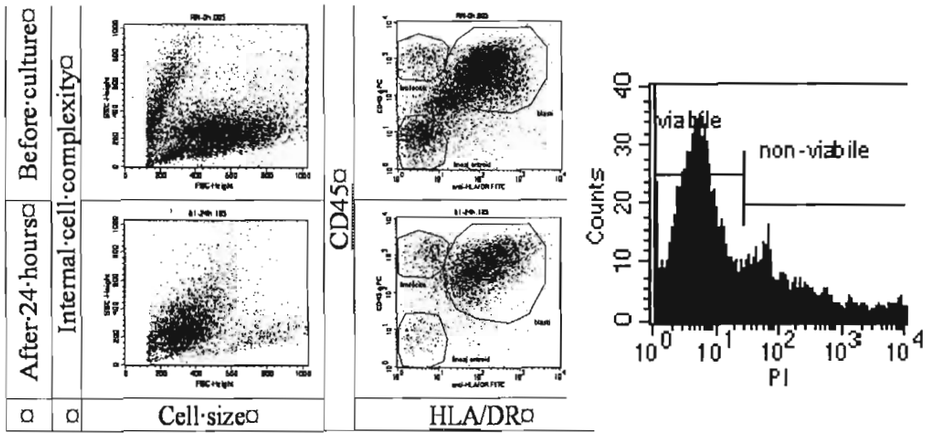


Fig. 1. The gating strategy (flow cytometry, FACSCalibur, CellQuest software, Becton Dickinson) used for the evaluation of the viability of AML cells

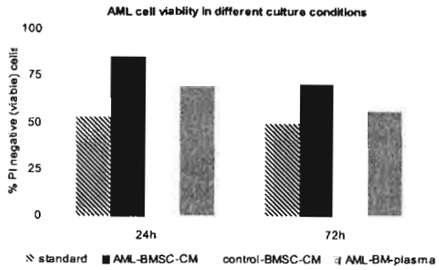


Fig. 2. The comparison of *in vitro* AML cell viability upon different culture conditions

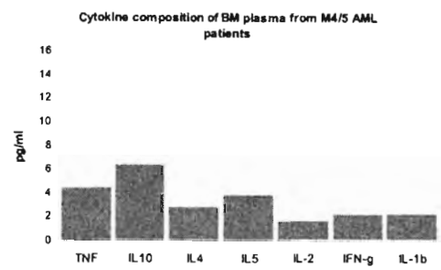


Fig. 3. Cytokine composition of BM plasma from M4/5 AML patients (n=8 for IL1b and n=4 for the others)

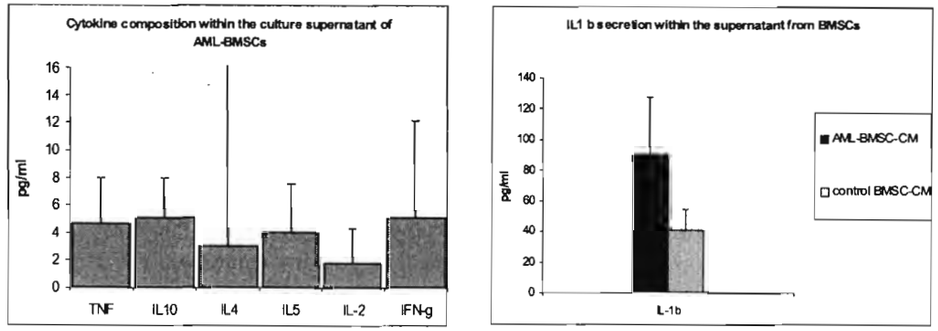


Fig. 4. a.Cytokine composition of the culture supernatant (conditioning medium, CM) of BMSC from M4/M5 AML patients (AML BMSC CM) and healthy subjects (control BMSCs CM) b. Il1 β secretion within the supernatants from AML- BMSC CM and control BMSCs CM

the individual assets of flow cytometry and solid phase (microbeads)-cytokine capturing systems in order to detect multiple plasma cytokines simultaneously. We used such a system to evaluate the presence and quantity of 6 different cytokines in the plasma of 4 patients with M4/5 AML that were not on active therapy. BM plasma from 8 M4/5 AML patients was additionally assessed for the presence and concentration of IL1 b by ELISA (Quantikine, R&D Systems). The detectable plasma levels of the tested cytokines were very low, with a slightly higher production of IL-10 (fig. 3).

IL-10 production is known to be restricted to cells within the hematopoietic lineage. There are no data on IL-10R expression on AML cells, however, it has been shown by others that IL-10 stimulates cancer cell proliferation through secondary signals via oncostatin M and IL-11 (10). Our finding, alongside with the known contribution of IL-10 to inducing a state of immune tolerance against tumors (by suppressing function and differentiation ability of DCs) suggest that IL-10 production may be a key event within the BM microenvironment in AML (11). However, its level in the BM plasma of the tested patient was not significant.

The assessment cytokine production in the culture supernatant. We evaluated 7 cytokines levels in AML patients culture supernatants (CM1): IL-1β (ELISA, Quantikine, R&D Systems) and TNF-a, IL-10, IFN-g, IL-4, IL-5, IL-2 (flow cytometry, BD

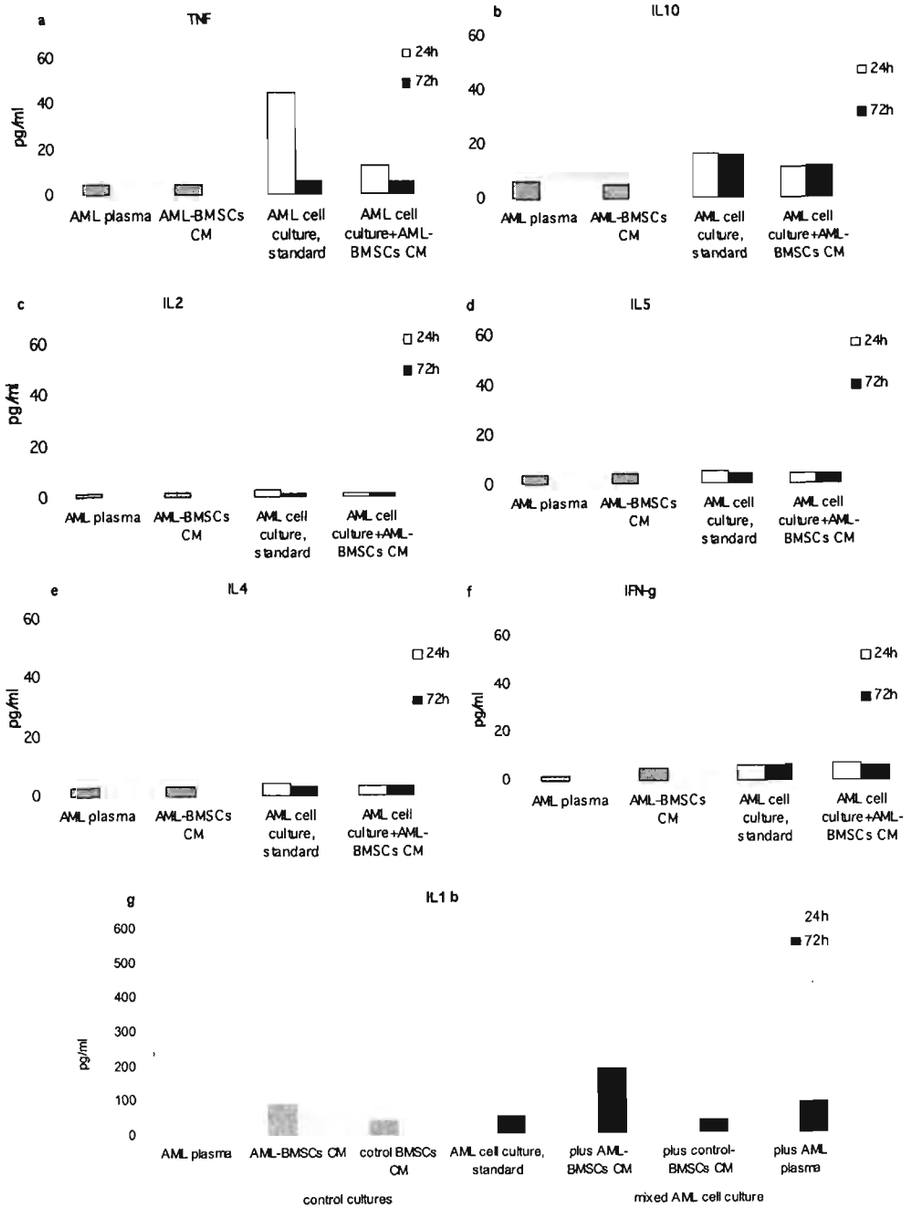


Fig. 5. Cytokine expression levels in plasma and culture supernatants of patients stromal cells (CM1), healthy subjects stromal cells (CM2), leukemia cells in standard conditions (RPMI+10%FCS) and in mixed cuture (with CM1 or CM2)

CBA Cytokine Detection kit, Becton Dickinson). More, we measured IL1b level in healthy subjects culture supernatants (CM1 and CM2). We found very low cytokines levels in culture supernatants (fig 4 a) but, with high level of IL-1b in CM1 up to 130 pg/ml (fig 4b). In healthy subjects culture supernatants (CM2) we note significantly low levels than patients culture supernatants (CM1).

The comparative analysis of the cytokine expression levels in the BM plasma from M4/M5 AML patients, in the culture supernatant from BMSC of AML patients and healthy subjects and in the culture supernatants of AML cells with or without the influence of stroma, reveled the following facts: with the exception of IL1b, none of the assessed cytokine was elevated within the mixed cultures (fig. 5 a to f). On the contrary, it seems that at least in the case of TNF α (fig. 5a), and, to a lesser extent, IL 10 (fig. 5b) a slight decrease of their levels has been observed. Significant differences were noted in the case of IL1β within the mixed cultures of AML cells with AML-BMSC-CM, both at 24 hours and 72 hours (fig. 5g). Of note was the absence of this phenomenon in the presence of control BMSC-CM, which suggests the contribution of BMSCs from AML patients to the generation of particular factors, which may be key players involved in the *in vivo* maintenance of the malignant clone. In order to confirm the current results the level of IL1β needs to be assessed on extended study groups.

CONCLUSIONS

Particularities in the cytokine network may be directly involved in many types of leukemia and autocrine and paracrine activities by leukemic and normal cells represent largely the mechanisms of survival for these cells. Therefore, a successful therapy for leukemia should deprive leukemic cells of the cytokine(s) necessary for their survival with minimal effect on normal cells. Such treatment may be difficult *in vivo* because (i) many cell types in the body may produce any type of cytokine(s), (ii) the cytokine(s) produced is/are likely to be necessary for growth and function of normal hematopoietic cells, and (iii) malignant cells survival may not be strictly depending on one specific cytokine. Therefore, a successful therapeutic approach should determine the cytokines that are necessary for the initiation or progression of a given disease. Consequently, the therapeutic combination, which results in maximum cytotoxicity to leukemic cells and minimal effect on normal cells, may be, on a long term, determined.

AKNOWLEGDMENTS

This study was performed by support of CNCSIS grants program 1149/2007.

REFERENCES

1. Moqattash S, Lutton J. Leukemia cells and the cytokine network: therapeutic prospects. *Exp Biol Med* 2004; 229: 121-137.
2. Bruserud O. IL-4, IL-10 and IL-13 in acute myelogenous leukemia. *Cytokines Cell Mol Ther* 1998; 4 (3): 187-198.
3. Ezaki K, Tsuzuki M, Katsuta I. Interleukin-1 beta (IL-1 beta) and acute leukemia: in vitro proliferative response to IL-1 beta, IL-1 beta content of leukemic cells and treatment outcome. *Leuk Res* 1995; 19 (1): 35-41.

4. Wu S, Korte A, Kebelmann-Betzing C, Gessner R, Henze G, Seeger K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of predinsolone on cytokine expression, *Leuk Res* 2005; 29: 63-72.
5. Manakova TE, Tsvetaeva NV, Levina AA et al. In vivo production of cytokines by BM stromal cells and macrophages from patients with myelodysplastic syndrome. *Bull Exp Biol Med* 2001; 132 (1): 633-636.
6. Ghia P, Granziero L, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Chronic B cell malignancies and bone marrow microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 149-155.
7. Ghia P, Caligaris-Cappio F. The indispensable role of microenvironment in the natural history of low-grade B cell neoplasms. *Adv Cancer Res* 2000; 79: 157-173.
8. de Bont ES, Vellenga E, Molema G, van Wering E, de Leij LF, Kamps WA. A possible role for spontaneous interleukin-8 production by acute myeloid leukemic cells in angiogenesis related processes: work in progress. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37 (6): 511-517.
9. Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA. Human B-cell interleukin-10 B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood* 1992; 80: 1289-1298. 72 S.
10. Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ et al. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF-ęB, c-Myc and pRb pathways. *J Immunol* 2001, 167: 6021-6030.
11. Kiertscher SM, Luo J, Dubinett SM, Roth MD. Tumors Promote Altered Maturation and Early Apoptosis of Monocyte- Derived Dendritic Cells. *J Immunol* 2000, 164: 1269-1276.

NOUTĂŢI

TRANSPLANTUL CELULELOR XENOGENE MODIFICATE GENETIC ŞI ÎNCAPSULATE AUGMENTEAZĂ ANGIOGENEZA ŞI ÎMBUNĂTĂŢEŞTE FUNCŢIA CARDIACĂ

Terapia genică bazată pe celule oferă o strategie alternativă pentru angiogeneza terapeutică utilizată în tratamentul infarctului acut de miocard (IMA). Cu toate acestea, rejetul imun reprezintă un obstacol semnificativ în calea implantării unor celule alogene sau xenogene modificate genetic. Există studii care experimentează o terapie genică ex vivo cu celule microîncapsulate care distribuie factor de creştere vascular endotelial (VEGF) miocardului ischemiat. Celule ovariene ale hamsterilor chinezeşti au fost modificate genetic pentru a secreta VEGF şi au fost încapsulate în microcapsule semipermeabile. Evaluarea in vitro a indicat faptul că aceste celule puteau secreta până la 3852 pg/ml la 48 de ore în ziua 8 după încapsulare. Celulele încapsulate au fost implantate în miocardul ischemiat de şobolan (model MI), în timp ce celule neîncapsulate, capsule goale şi ser au fost injectate la şobolanii martor. Evaluarea imunităţii umorale faţă de celulele xenogene la 2 săptămâni relevă că titrul anticorpilor a fost semnificativ mai scăzut în grupul la care s-au fost transplantate celule încapsulate comparativ cu grupul la care s-au administrat celule neîncapsulate. Evaluarea la 3 săptămâni nu a relevat o diferenţă semnificativă între cele 2 grupuri. Testele histologice şi Western Blot au confirmat faptul că celulele microîncapsulate îşi menţin structura originală precum şi secreţia de VEGF după 3 săptămâni. Densitatea capilară în regiunea tratată a fost semnificativ mai mare în grupul tratat cu celule încapsulate, concomitent cu o îmbunătăţire importantă a funcţiei cardiace. Aceste date sugerează faptul că terapia genică bazată pe celule xenogene microîncapsulate poate reprezenta o terapie inovatoare în tratamentul ischemiei cardiace (Zhang H, Zhu SJ, Wang W, Wei YJ, Hu SS. Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments angiogenesis and improves heart function. *Gene Ther* 2008; 15 (1): 40-48).

Ioana Dana Alexa

ASPECTE ULTRASTRUCTURALE ÎN DEZVOLTAREA NEFRONULUI UMAN. STUDIU DE MICROSCOPIE ELECTRONICĂ

T. Petreuş[1], Anca Indrei[2], Carmen Elena Cotrutz[1], C. Moşoiu[1], C. Cotrutz[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Disciplina de Biologie Celulară şi Moleculară
Facultatea de Medicină Dentară
2 Disciplina de Anatomie şi Embriologie

ULTRASTRUCTURAL ASPECTS IN THE DEVELOPMENT OF THE HUMAN NEPHRON - ELECTRON MICROSCOPY STUDY (Abstract): We have looked for electron microscopy aspects tissue fragments of human nephrons harvested from fetuses of 7,5-19 weeks to show ultrastructure aspects of the nephron during development. **Material and methods**: We have used 9 fragments from human embryos; Four cases were aged of 7,5, 8, 12 and 17 weeks. The other 5 cases were between 18 and 19 weeks. Tissue fragments were fixed in glutaraldehyde at 4°C and processed by the classic technique. **Results**: The electron microscopy study shows the evolutive steps of the human nephron (stages I-IV), stages met for the 12-19 weeks embryo. For the cases under this age the metanephrogenic blastema was dominant. In the IVth development stage, the cells in the proximal tubule show a higher development degree than the distal segments. **Conclusion**: These observations indicate that during early development the proximal segment is better developed and probably more functional than the distal segments. **Key words**: HUMAN NEPHRON, DEVELOPMENT, ULTRASTRUCTURE, METANEPRHOS

În stadiile I şi II, respectiv vezicula renală şi corpi în S, celulele epiteliale au o ultrastructură relativ asemănătoare. În stadiul III, diferenţele sunt în continuare minore între segmentele distale ale nefronului în timp ce diferenţe marcante apar între segmentele proximale şi distale. În stadiul IV pot fi deja identificate structuri care sunt prezente şi la nivelul rinichiului adult (1,2,3).

MATERIAL ŞI METODĂ

Am utilizat 9 fragmente recoltate de la embrioni umani, obţinuţi prin avort spontan sau la cerere. Patru dintre cazuri au avut vârste de 7,5, 8, 12 şi 17 săptămâni. Celelalte 5 cazuri au avut vârste cuprinse între recoltate 18 şi 19 săptămâni. Fragmentele tisulare au fost fixate imediat în glutaraldehidă la 4°C şi preparate specific pentru microscopie electronică de transmisie.

REZULTATE

Pentru embrionul de 7 săptămâni studiul de microscopie electronică a pus în evidenţă structura caracteristică a blastemului metanefrogen. În această zonă de recoltare se remarcă aparenta lipsă de coeziune dintre celule, cu unele schiţe de contacte focale. Ulterior în evoluţie, prezentăm imagini preluate din zona blastemului metanefrogen de la embrionul de 8 săptămâni. Raportul nucleo-citoplasmatic devine mai redus, deşi rămâne supraunitar (fig. 1,2).

Ultrastructura veziculei renale. Ca ultrastructură, am observat că vezicula renală este compusă din celule prismatice

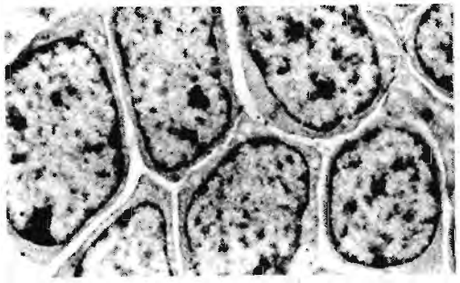


Fig. 1. Blastem metanefrogen - aspect general. TEM x4000

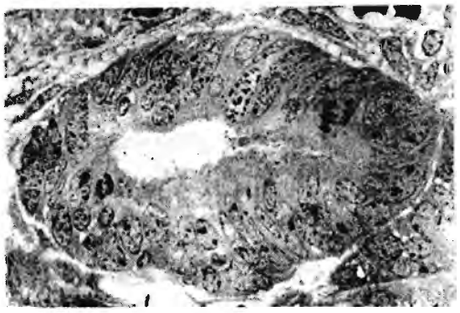


Fig. 3. Veziculă renală prezentând celule aplatizate cu un grad redus de diferenţiere. Se observă celule în diviziune (metafază). TEM x1000

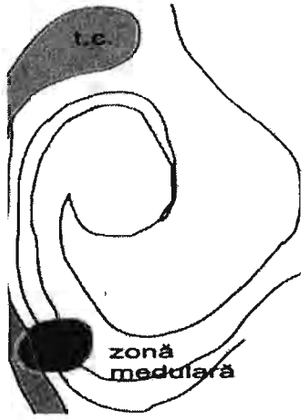


Fig. 5. Corp S (stadiul 2 de dezvoltare a nefronului). Zona medulară este situată în proximitatea tubului colector. Ampula tubului colector este amplasată în zona corticală. Marcajul închis reprezintă zona luată în studiu

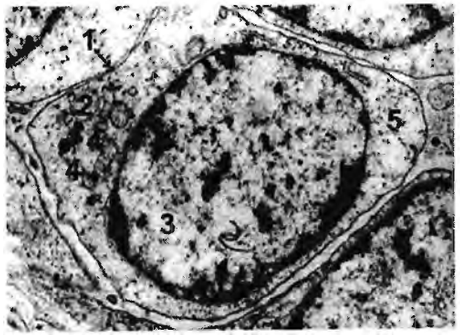


Fig. 2. Blastem metanefrogen. 1-Schiţă de joncţiune de adezivitate ; 2-Mitocondrii ; 3-Nucleu ; 4-Reticul endoplasmatic rugos ; 5-Ribozomi liberi

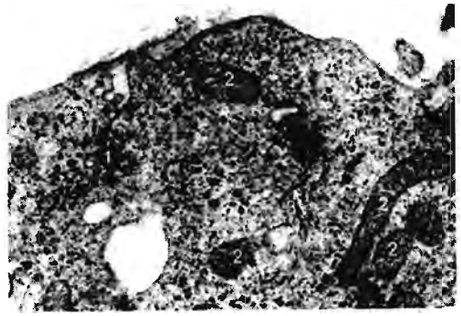


Fig. 4. Detaliu asupra unei celule din vezicula renală stadiul I. Se observă prezenţa reticulului endoplasmatic rugos cu ribozomi şi ribozomi liberi şi organitelor generatoare de energie (mitocondrii - 2). Joncţiunile intercelulare bine reprezentate de situsuri de adezivitate (1). În citoplasmă se remarcă şi prezenţa microtubilor (3). TEM x 20.000

înalte sau cilindrice, orientate radiar (fig. 3). Nucleii acestor celule sunt mari, cu nucleoli bine delimitaţi şi cu un număr semnificativ de figuri mitotice. De remarcat este numărul scăzut de diferenţe notabile între celulele din diferite regiuni ale veziculei. Se observă de asemenea, câţiva microvili imaturi la nivelul suprafeţei apicale a celulelor. La nivelul polilor lateroapicali se remarcă prezenţa unor joncţiuni localizate imediat suprajacent faţă de desmozomi. La nivelul desmozomilor, intracitoplasmatic se

extinde o reţea microfilamentoasă slab dezvoltată (fig. 4)

Ultrastructura corpilor S şi a regiunii tubulare corespondente. Corpii S prezintă două porţiuni structural diferite şi anume porţiunea tubulară şi zona medulară (fig.5). La nivelul celulelor tubului colector adiacent se remarcă prezenţa a numeroşi microvili scurţi şi a numeroase vezicule localizate sub plasmalema polului apical. Celulele sunt cuplate la polul lateroapical prin joncţiuni strânse. Subjacent se observă prezenţa desmozomilor maculari. Reticulul endoplasmatic rugos este abundent şi re remarcă şi prezenţa ribozomilor liberi. Mitocondriile sunt de asemenea prezente într-un număr semnificativ. Nu se remarcă diferenţe majore între celulele din stadiul de veziculă renală şi celulele regiunii tubulare aparţinând corpilor S. Singurele menţiuni se referă la o uşoară scădere a înălţimii celulare în evoluţie de la stadiul I la stadiul II. Capătul proximal al regiunii tubulare aparţinând corpilor S este localizat paralel cu tubul colector adiacent al aceluiaşi nefron ; celulele adiacente tubului colector sunt mai aplatizate similar celulelor din capsula Bowman.

Ultrastructura unor segmente ale nefronului în stadiul III. La nivelul tubilor proximali celulele încep să dezvolte marginea în perie, aspect caracteristic celulelor din nefronul adult. Dezvoltarea acestor specializări ale plasmalemei polului apical va face deosebirea între segmentul proximal şi distal în această etapă evolutivă. Din punct de vedere al structurării organitelor celulare sau al dimensiunilor, diferenţele între segmentele menţionate sunt mici. În general am remarcat o scădere uniformă a înălţimii celulelor în stadiul III faţă de stadiul II. La nivelul polului apical se remarcă prezenţa cililor vibratili şi a microvililor. Numărul cililor vibratili scade semnificativ de la nivelul tubului proximal, unde se pot întâlni până la 30 incidenţe de secţiune prin aceste structuri, către regiunea juxtaampulară a tubului (maxim 5 incidenţe secţionale). În fiecare segment, modelul de organizare al cililor a variat de la 7 microtubi izolaţi la 9 dublete periferice. Organitele celulare nu prezintă diferenţe marcate faţă de stadiul precedent. Mitocondriile sunt distribuite asemănător şi dimensional nu prezintă particularităţi decelabile. La nivelul membranei bazolaterale se remarcă absenţa labirintului bazal şi a interdigitaţiilor, fapt observat şi în stadiul II.

Ultrastructura segmentelor distale în stadiul IV. Acest stadiu a fost mai uşor de depistat la embrionii de 17-18 săptămâni. În stadiul IV, nefronul prezintă ansa Henle, cu un segment descendent şi un segment ascendent, tubul contort distal şi segmentul aparatului juxtaglomerular care cuprinde macula densa. *Tubul contort proximal* prezintă un grad înalt de diferenţiere, ultrastructura fiind apropiată de cea a tubului contort proximal adult. Se observă o margine în perie dezvoltată, vezicule de endocitoză şi numeroşi lizozomi şi mitocondrii abundente Joncţiunile strânse sunt slab organizate. Se observă dispoziţia continuă a membranei bazale la acest nivelul acestor celule (fig.7). *Zona tranziţională* între seg-

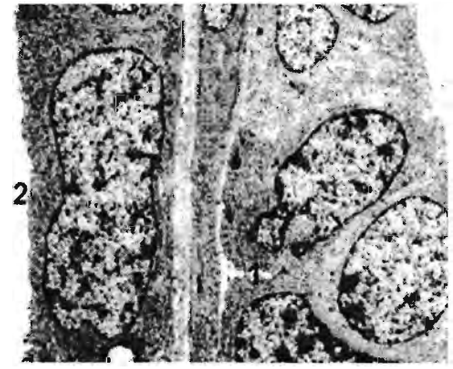


Fig. 6. Corp S. Detaliu la nivelul schiţei de tub contort proximal. 1. lumenul tubului contort proximal în stadiu evolutiv incipient ; 2. tubul contort distal. TEM x7000

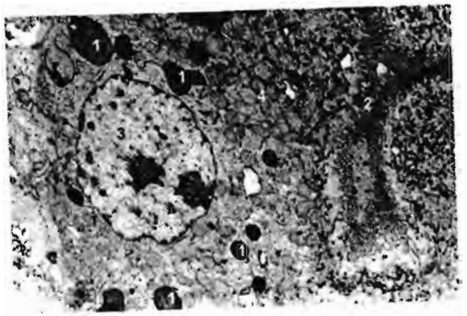


Fig. 7. Celule ale regiunii proximale ale nefronului în stadiul IV. 1. lizozomi; 2. margine în perie (microvili); 3. nucleu; 4. mitocondrii. TEM x9000

mentul proximal şi regiunea descendentă a ansei Henle la nivelul nefronului uman matur este scurtă şi abruptă. La nivelul nefronului în dezvoltare, această zonă ocupă lungimea a 5-6 celule, aceste celule prezintă un număr redus de interdigitaţii bazo-laterale şi lizozomi faţă de celulele din tubul proximal. Celulele regiunii de tranziţie sunt mult aplatizate, iar la nivelul polului apical numărul şi dimensiunile microvililor sunt mult diminuate (fig. 8). Celulele *segmentelor distale* sunt mult mai puţin diferenţiate iar dimensiunile lor sunt variabile. De exemplu, celulele din regiunea maculei densa sunt mai înalte. Diametrul tubular este astfel mai redus iar grosimea peretelui este puţin crescută. Membrana bazală este multistratificată şi fuzionează cu membrana

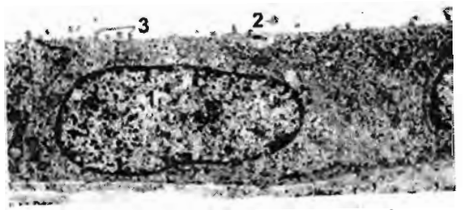


Fig. 8. Celulă la nivelul regiunii descendente a ansei Henle, la nefronul în stadiul IV. Dimensiunile sunt reduse pe aspectul transversal (celule aplatizate). Se observă dimensiunile şi numărul redus al microvililor. 1. nucleu aplatizat; 2. cil vibratil; 3. microvili scurţi. TEM x7000

bazală a celulelor glomerulare subjacente. Ca ultrastructură, celulele din această regiunea sunt similare celulelor vecine din tubul distal (fig. 9). *Tubii colectori*. Celulele de la nivelul ampulei tubilor colectori au prezentat o ultrastructură relativ uniformă. Se remarcă doar o înălţime uşor crescută la acest nivel faţă de celelalte segmente. Am observat prezenţa microvililor la nivelul suprafeţei lumenale a unor celule în timp ce altele prezentau o suprafaţă apicală netedă (fig. 10). În general, am observat că ultrastructura celulelor din regiunile medulară sau corticală ale tubilor colectori este asemănătoare. Majoritatea celulelor zonei medulare a tubului colector prezintă la polul apical microvili scurţi şi vezicule. Membrana bazală prezintă câteva pliuri şi interdigitaţii. Mitocondriile nu sunt ataşate la acest nivel iar organizarea diferă faţă de

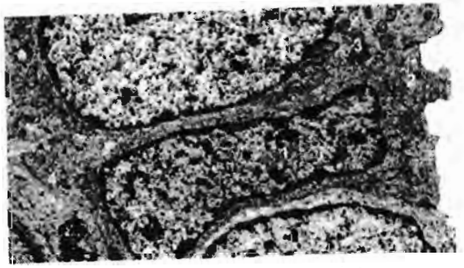


Fig. 9. Celule la nivelul maculei densa a nefronului în stadiul IV. 1. nucleu; 2. joncţiune strânsă la polul latero-apical; 3. mitocondrii, 4. membrană bazală. TEM x10.000

Fig. 10. Celule ale tubului contort distal. Ultrastructură simplă cu 1. nucleu; 2. mitocondrie; 3. lizozomi, în număr redus. TEM x12.000

celulele din nefronul la adult. Majoritatea celulelor din tubii colectori au prezentat granule de glicogen, cu dimensiuni puţin mai mari decât ale ribozomilor, depozitate în special la polul bazal.

CONCLUZII

Studiul de microscopie electronică prezintă succint etapele evolutive ale nefronului uman (stadiile I-IV), stadii pe care leam întâlnit la cazurile studiate pentru vârste cuprinse între 12-19 săptămâni. Pentru cazurile sub această vârstă, a predominat prezenţa blastemului metanefrogen.

Interesant de observat este diferenţa de dezvoltare dintre segmentele nefronului, diferenţe prezentate în imaginile de mai sus. Astfel, în stadiul IV de evoluţie, celulele tubului proximal prezintă un grad mai mare de diferenţiere decât celulele segmentelor distale. În timp ce celulele segmentelor distale nu prezintă multe din caracterele celulelor mature corespondente, celulele tubului proximal prezintă o margine în perie bine dezvoltată, formată din microvili cu structură caracteristică aspectelor ultrastructurale la adult (miez de 15-20 filamente de actină). De asemenea, celulele tubului proximal prezintă o serie de vezicule apicale, ceea ce denotă o activitate de macrotransport intensă la acest nivel, precum şi o accentuare a plierii membranelor bazolaterale, aspect absent la celulele din segmentele distale.

Aceste observaţii indică faptul că în timpul dezvoltării precoce, segmentul proximal este mai bine dezvoltat şi probabil funcţional mai activ decât segmentele distale.

BIBLIOGRAFIE

1. Andrews PM. Scanning electron microscopy of human and rhesus monkey kidneys. *Lab Invest* 1975; 32: 610-618.
2. Bard JBL, Davies JA, Karavanova I, Lehtonen E, Sariola H, Vainio S. Kidney development: the inductive interactions. *Sem Cell Dev Biol* 1996; 7: 195-202.
3. Caruana G, Young RJ, Bertram JF. Imaging the embryonic kidney. *Nephron Exp Nephrol* 2006; 103 (2): 62-68.

NOUTĂŢI

RELAŢIA DINTRE RIGIDITATEA ARTERIALĂ, PEPTIDUL NATRIURETIC PLASMATIC, ADRENOMEDULINĂ ŞI NIVELURILE DE HOMOCISTEINĂ

Creşterea rigidităţii arteriale, valorile crescute ale peptidului natriuretic plasmatic şi hiperhomocisteinemia determină amplificarea riscului cardiovascular. Funcţia arterială a fost cercetată prin tonometrie la 1962 subiecţi (56% femei, vârsta medie 61 ani), măsurându-se: presiunea de puls, unda reflectată, diferenţa de velocitate carotidă-femurală şi carotidă-radială. Peptidele natriuretice s-au corelat cu diferenţa de velocitate a pulsului carotidă-femurală şi carotidă-radială şi cu unda reflectată a pulsului carotidian şi a presiunii de puls. La bărbaţi, adrenomedulina a fost asociată cu presiunea arterială medie, iar homocisteina cu diferenţa velocităţii carotidă-femurală (Levy D et al. Associations of plasma natriuretic peptide, adrenomedullin, and homocysteine levels with alterations in arterial stiffness. The Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 114: 1743-1756).

Corina Dima-Cozma

EMINENŢA ARCUATĂ A STÂNCII TEMPORALE ASPECTE DESCRIPTIVE

M. Tanasi[1], T. Hârşovescu[1], B. Balmeş[1], C. Istode[1], Aida Mihailovici[1], D. Paduraru[2]
Universitatea "Titu Maiorescu" Bucureşti
Facultatea de Medicină
1 Catedra de Anatomie
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
2 Catedra de Anatomie

THE ARCUATE EMINENCE OF THE PETROUS PORTION OF THE TEMPORAL BONE. DESCRIPTIVE FEATURES (Abstract): The superior semicircular canal is an important landmark in the middle cranial fossa approach to the temporal bone and the internal acoustic meatus. This mark is frequently located by its topographic association to the arcuate eminence, a bony prominence located on the anterior surface of petrous portion of the temporal bone. In recent studies, otolaryngologists described that the arcuate eminence lies more posterior and laterally than the superior semicircular canal and stated that some eminences corresponded to sulci of the temporal lobe, of which most were traces of the occipitotemporal sulcus. Our work examines by dissection the relationship of the arcuate eminence to the superior semicircular canal, demonstrating a third origin of the arcuate eminence: well pneumatized temporal bones in the region of the epitympanic reces. **Key words**: ARCUATE EMINENCE, SUPERIOR SEMICIRCULAR CANAL, MIDDLE CRANIAL FOSSA, TEMPORAL AIR CELLS

Urechea medie este reprezentată de o serie de cavităţi şi canale situate în stânca osului temporal. Ea este compusă dintr-o porţiune principală - cavitatea timpanică, ce comunică anterior cu nazo-faringele prin trompa auditivă (faringo-timpanică, descrisă de Eustachio) iar posterior cu celulele mastoidiene prin *aditus ad antrum*.

Peretele posterior sau mastoidian, în unghiul sau superior are un orificiu care comunică printr-un scurt canal - aditus ad antrum - cu o serie de cavităţi numite celule mastoidiene, care pot fi comparate cu un fagure.

Cea mai voluminoasă celulă mastoidiană se numeşte antru şi este prima care apare, încă din luna a 5-a sau a 6-a de viaţă intrauterină.

După gradul de pneumatizare, se descriu trei tipuri de mastoidă:

- tip pneumatic - cu celule mari;
- tip diploic - cu celule mici;
- tip sclerotic - aproape fără celule.

În afară de celulele grupate în jurul antrului, mai pot exista şi grupuri aberante (paramastoidiene), localizate în zone mai îndepărtate: temporo-zigomatice, retromastoidiene sau pietroase.

Peretele superior (*tegmen tympanii*), numit şi tavanul cavităţii timpanice, este constituit dintr-o lamă osoasă subţire ce corespunde etajului mijlociu al endobazei, pe faţa anterioară a stâncii temporale.

La nivelul acesteia, dinspre anterior şi medial spre posterior şi lateral (fig. 2) au fost descrise mai multe repere:

Fig. 1. Antrul mastoidian împreună cu restul celulelor mastoidiene

Fig. 2. Fosa craniană mijlocie

Fig. 3. Eminenţa arcuată şi *tegmen tympanii* văzute dinspre fosa craniană posterioară

- imediat posterior de vârful stâncii se află impresiunea trigeminală, pe care se sprijină ganglionul trigeminal (descris de Gasser), învelit într-o dedublare a durei mater;
- în spatele acesteia, în interiorul stâncii, găsim cohleea (1), al cărei vârf priveşte spre anterior şi lateral;
- tot în partea anterioară, aproape de marginea inferioară a stâncii, se află posterior şi lateral hiatusul nervului pietros mare (hiatusul descris de Fallopio), continuat anterior şi medial cu şanţul nervului pietros mare. Nervul pietros mare la nivelul găurii rupte se anastomozează cu nervul pietros profund.
- hiatusul şi şanţul nervului pietros mic, situate inferior de precedentele, se îndreaptă anterior, spre sutura pietro-sfenoidală;
- eminenţa arcuată (fig. 3), o proeminenţă rotunjită, prezentă la majoritatea craniilor (2), localizată în jumătatea laterală a stâncii temporale, pornind din dreptul marginii superioare a stâncii (3); posterior de aceasta s-ar găsi canalele semicirculare posterior şi lateral ale urechii interne;
- *tegmen tympanii*, suprafaţă netedă sau uşor concavă, acoperă recesul epitimpanic şi antrul mastoidian ale urechii medii (4).

Majoritatea autorilor clasici au susţinut că eminenţa arcuată este ridicată de canalul semicircular anterior (superior) al urechii interne.

Acesta este un reper important (5) în abordul chirurgical al conductului auditiv intern şi nervului acustico-vestibular, plecând din fosa craniană mijlocie, iar numeroase constatări intraoperatorii (6,7) au infirmat asocierea dintre labirintul urechii interne şi eminenţa arcuată. De aceea s-a sugerat că eminenţa arcuată ar fi o eminenţă mamilară, determinată de unul din şanţurile dintre girii feţei bazale a emisferei cerebrale, cel mai frecvent şanţul occipito-temporal (2,8).

MATERIALE ŞI METODĂ

Pentru studiu s-au folosit 5 cadavre umane, 3 de sex feminin şi 2 de sex masculin, având vârste cuprinse între 51 şi 66 de ani,

precum şi două cranii preparate, care, conform datelor antropometrice, au aparţinut unor persoane de sex masculin.

Nici unul dintre cadavre nu prezenta anomalii sau malformaţii ale extremităţii cefalice. În toate cele 5 cazuri, decesul nu s-a datorat unor cauze neurologice, otorino-laringologice sau osoase.

Cadavrele au fost formolizate prin injectare în artera femurală urmată de păstrarea în cuvă cu formol pe o perioadă de cel puţin 6 luni. La toate acestea, după îndepărtarea calvariei urmată de prelevarea encefalului, s-a disecat stânca temporală prin trepanare.

Doar patru dintre aceste cadavre prezentau eminenţe arcuate bine vizibile; la cel de-al cincilea, de sex feminin, eminenţa arcuată, puţin proeminentă, era asociată cu un grad redus de pneumatizare a osului temporal.

Unul dintre cele două cranii prezenta urmele unui proces osteitic al stâncii temporale, localizat pe jumătatea posterioară a eminenţei arcuate şi *tegmen tympanii*, în timp ce al doilea craniu nu prezenta anomalii, malformaţii sau procese patologice.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Abordul stâncii temporale a fost efectuat la nivelul endobazei, prin faţa sa anterioară. S-au pus în evidenţă: ganglionul trigeminal, gaura spinoasă, nervul pietros mare.

După identificarea eminenţei arcuate, considerată clasic ca fiind ridicată de canalul semicircular superior, am început îndepărtarea tablei osoase din porţiunea situată lateral, descrisă ca *tegmen tympanii* (fig. 4). După 3 – 4 mm, structura osoasă se schimbă, osul compact fiind înlocuit de os spongios (fig. 5).

Fig. 4. Delimitarea *tegmen tympanii*; se observă ggl. trigeminal, n. pietros mare şi hiatusul acestuia

Fig. 5. Aspectul tablei interne în zona *tegmen tympanii*

Fig. 6. Extinderea disecţie la nivelul eminenţei arcuate

Fig. 7. Evidenţierea canalului semicircular superior şi a recesului epitimpanic

Fig. 8. Îndepărtarea peretelui superior al conductului auditiv intern

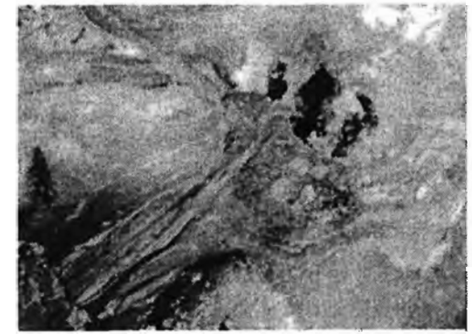


Fig. 9. Emergenţa n. pietros mare din dreptul genunchiului canalului facialului

Fig. 10. Urmele unui proces osteitic ce a afectat eminenţa arcuată

După îndepărtarea tablei osoase se evidenţiază numeroase cavităţi cu aspect neregulat, asemănătoare celulelor mastoidiene. Se practică trepanarea cavităţilor osoase până la o adâncime de aproximativ 15 mm, urmărind evidenţierea recesului epitimpanic.

Deoarece nu a fost pusă în evidenţă nici o cavitate asemănătoare cavum-ului timpanic, s-a decis extinderea suprafeţei de disecţie, către eminenţa arcuată şi marginea superioară a stâncii temporale (fig. 6).

La 5 – 6 mm anterior şi medial de eminenţa arcuată s-a descoperit canalul semicircular superior. La aceeaşi distanţă, anterior şi lateral de eminenţă s-a evidenţiat o cavitate cu dimensiuni net superioare celulelor mastoidiene (fig. 7). Totodată, în aria de disecţie, prin îndepărtarea peretelui superior al meatului acustic intern se disting nervii facial, intermediar Wrisberg şi acustico-vestibular (fig. 8).

Concomitent, se vizualizează celelalte două canale semicirculare. Posterior de acestea se observă deschiderea apeductului vestibular în fosa subarcuată.

După identificarea genunchiului canalului facialului (fig. 9) şi a promontoriului, se deschide complet recesul epitimpanic

CONCLUZII

Pe piesele de disecţie, am constat următoarele particularităţi anatomice:

- În dreptul eminenţei arcuate se găseşte cavitatea timpanică, canalul semicircular superior fiind situat la aproximativ 5 mm mai anterior.
- Această observaţie este întărită de prezenţa, pe unul dintre craniile studiate a urmelor unui proces osteitic, cu aceeaşi localizare pe stânca temporală, având punct de plecare probabil urechea medie. (fig. 10).
- Aşa cum au evidenţiat şi alţi autori (9), eminenţa arcuată are o structură pneumatică, asemănătoare tablei interne din dreptul *tegmen tympanii*.

• *Tegmen tympanii* acoperă doar parţial recesul epitimpanic, porţiunea sa laterală găsindu-se în dreptul conductului auditiv extern.

BIBLIOGRAFIE

1. Clara M. *Das Nerven System des Menschen.* Leipzig : Georg Thieme, 1940.
2. Tsunoda A, Kimura Y, Sumi T, Komatsuzaki A, Sato T. The arcuate eminence is not a protrusion of the superior semi-circular canal but a trace of sulcus on the temporal lobe. *J Laryngol Otol* 2000 ; 114 : 340-344.
3. Faure A, Masse H. et al. What is the arcuate eminence ? *Surg Radiol Anat* 2003 ; 25 : 99-104.
4. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH (editors). *Gray's Anatomy.* 38th ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 1993.
5. Sindel M, Agirdir BV, Yildirim FB. An important landmark in the middle cranial fossa approach : the arcuate eminence. *Turk Arch Otolaryngol* 2002 ; 40 : 9-12.
6. Dautheribe M, Miguei A, Vita JM, Guérin J. Anatomical basis of the extended subtemporal approach to the cerebellopontine angle : its value and limitations. *Surg Radiol Anat* 1989 ; 11 : 187-195.
7. Kawase T, Shiobara R, Toya S. Anterior transpetrosal-transtentorial approach for sphenopetroclival meningiomas : surgical method and results in 10 patients. *Neurosurgery* 1991 ; 28 : 869-876.
8. Tummala R, Coscarella E, Morcos J. Trans-petrosal approaches to the posterior fossa. *Neurosurg Focus* 2005 ; 19 (2) : E6.
9. Kartush JM, Kemink JL, Graham MD. The arcuate eminence : Topographic orientation in middle cranial fossa surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1985 ; 94 : 25-28.

NOUTĂŢI

CONCENTRAŢIA PLASMATICĂ DE VITAMINA C – UN FACTOR PREDICTIV PENTRU RISCUL DE AVC

Un studiu prospectiv, ce a recrutat 20649 de subiecţi de ambe sexe, cu vârsta cuprinsă între 40 şi 79 de ani, fără risc de accident vascular cerebral (AVC), participanţi la o anchetă prospectivă europeană asupra cancerului în populaţia din Norfolk (European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk prospective population study) a examinat relaţia dintre concentraţia plasmatică a vitaminei C şi riscul de AVC. Participanţii au completat un chestionar de sănătate generală şi au fost consultaţi anual din 1993 până în 1997. AVC au fost depistate până în 2005 şi au fost în număr de 445. O analiză de regresie Cox pentru riscurile proporţionale a arătat că persoanele clasate în 1/3 superioară pentru valorile iniţiale ale vitaminei C pasmatice au prezentat un risc scăzut, de 42%, faţă de subiecţii cu valori plasate în 1/3 inferioară (RR : 0,58, interval de încredere 95% : 0,43-0,78). Aceste rezultate au fost independente de vârstă, sex, tabagism, indice de masă corporală, TA, colesterol, activitate fizică, incidenţa diabetului şi a infarctului de miocard, clasă socială, consum de alcool sau de suplimente alimentare. Rezultate similare au fost obţinute după excluderea utilizatorilor de suplimente alimentare conţinând vitamina C şi a persoanelor care au prezentat un AVC în primii 2 ani de supraveghere. În concluzie, concentraţia plasmatică de vitamină C poate reprezenta un marker biologic pentru persoanele cu risc crecut de AVC (Myint PK et al. Plasma vitamin C concentration predict risk of incident stroke over 10 years in 20149 participants of the European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk prospective population study. *Am J Clin Nutr* 2008 ; 87 : 64-69).

Al.D. Ciochină

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi – 2008 – vol. 112, nr. 1

EFECTUL EXPUNERII CRONICE LA FUM DE ŢIGARĂ ASUPRA FUNCŢIEI VASOMOTORII A ENDOTELIULUI ARTERELOR PULMONARE DE COBAI

O. Fira-Mladinescu[1,2], Lavinia Noveanu[3], V. Ordodi[3], Corneluţa Fira-Mladinescu[1], V. Tudorache[4], Georgeta Mihalaş[3]

Universitatea de Medicină şi Farmacie "V. Babeş" Timişoara
Facultatea de Medicină
1 Centrul de Studii în Medicina Preventivă
2 Disciplina de Fiziopatologie
3 Disciplina de Fiziologie
4 Disciplina de Pneumologie

THE EFFECTS OF CHRONIC EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE ON VASOMOTOR ENDOTHELIAL FUNCTION OF GUINEA PIG PULMONARY ARTERIES (Abstract) : Chronic exposure to cigarette smoke on guinea-pigs induced a muscularisation of pulmonary arterioles and endothelial dysfunction might be an early trigger of this vascular remodelling. Accordingly, the present study was aimed to evaluate the effect of a 12 weeks exposure to passive smoking on the pulmonary endothelial vasomotor function. **Material and method** : Vasodilator response of pulmonary arteries rings isolated in organ bath, precontracted with phenilephrine, was compared in the presence of cumulative doses (10^{-9} to 10^{-4} M) of endothelial-dependent (acetylcholine, ACh and adenosine-diphosphate, ADP) and independent vasodilators (sodium nitroprusside, SNP), respectively. **Results** : Our results suggest that chronic exposure of guinea-pigs to cigarette smoke induces the impairment only of NO-mediated endothelial response (vasodilation was 9.83 ± 4.36 % for ACh 10^{-5}M vs. 39.72 ± 16.61 % in control, p = 0.005, respectively 36.64 ± 7.21 % for ADP 10^{-5}M vs. 55.53 ± 13.51 %, p = 0.02). **Conclusion** : The *in vitro* study of pulmonary arteries vasomotor function in guinea pigs chronically exposed to cigarette smoke may represent a reliable and relevant experimental model for the assessment of pulmonary endothelial dysfunction in early stages of COPD. **Key words** : PULMONARY ENDOTHELIAL DYSFUNCTION, TOBACCO SMOKING, CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

O mare varietate de specii animale au fost expuse la fumul de ţigară, şi anume cobai (Wright, 1990), iepuri (Unlu, 2006), câini (Wright, 2002), şobolani şi şoareci (March, 1999). Dintre acestea cea mai susceptibilă s-a dovedit a fi cobaiul, aceste animale dezvoltând leziuni pulmonare de tip BPOC în câteva luni de expunere la fumul de ţigară (Wright, 1990). Mai mult, un studiu recent a demonstrat că o expunere cronică la fumul de ţigară induce hipertensiune pulmonară la cobai, iar nivelele presiunii arteriale se corelează cu o producţie crescută de mediatori vasoactivi, precum şi cu extinderea procesului de „muscularizare" a vaselor mici (Wright, 2006). Este important de subliniat că la cobaii expuşi cronic la fumul de ţigară (Wright, 1993), asemenea oamenilor cu BPOC (Kessler, 2001), creşterea presiunii din artera pulmonară tinde să fie doar moderată.

În acest studiu am avut ca obiective spe-

cifice: (1) evaluarea în baie de organ pe preparat vascular a efectului asupra funcţiei vasomotorii a endoteliului arterelor pulmonare a unui protocol de expunere pasivă la fum de ţigară a cobailor timp de 12 săptămâni; (2) validarea modelului nostru animal de expunere cronică la fum de ţigară ca relevant pentru studiul disfuncţiei endoteliale pulmonare indusă de fumat.

MATERIAL ŞI METODE

Animalele folosite au fost 10 cobai de sex feminin, cu vârsta de 6-8 săptămâni şi o greutatea cuprinsă între 250 şi 300 grame la includerea în studiu. Printr-o selecţie iniţială de tip randomizare unul la unul, cobaii au fost grupaţi în două loturi. Unul din loturi a fost expus timp de 12 săptămâni la fum de ţigară, iar celălalt grup a fost folosit ca şi lot de control.

Cobaii din lotul expus la fumul de ţigară au fost plasaţi timp de 2 ore pe zi într-o cameră de expunere la fum, o oră dimineaţa şi o oră seara. Camera de expunere la fum a constat dintr-o incintă de sticlă etanşă cu volumul de 0,56 m^3 prevăzută cu un capac cu orificiu prin care s-a introdus fumul generat de un dispozitiv de fumat ţigări. Protocolul de expunere la fumul de ţigară a constat în fumarea unei ţigări timp de 5 minute, urmată de 15 minute de expunere în continuare la fumul rezultat, înainte de a fi aprinsă următoarea ţigară. Per oră s-au fumat 3 ţigări, ceea ce a însemnat 6 ţigări/zi. Acest protocol a fost repetat timp de 7 zile pe săptămână, pe o perioadă de 12 săptămâni. Cobaii din lotul de control au fost şi ei plasaţi în incinta de expunere timp de 2 ore zilnic, cu menţiunea că în cazul acestora ţigara ataşată dispozitivului nu a fost aprinsă.

După o perioadă de 12 săptămâni de expunere, cobaii au fost sacrificaţi prin decapitare, după administrarea intraperitoneală de tiopental sodic 50 mg/kg corp, pentru a putea recolta artera pulmonară principală de la fiecare animal în parte.

Odată disecată artera pulmonară principală, de la fiecare cobai, s-a secţionat din aceasta un inel vascular cu diametrul de aproximativ 2 - 2,5 mm şi lăţimea de 2-3 mm. Inelul de arteră pulmonară a fost suspendat, cu ajutorul unui sistem de prindere din sârmă de oţel astfel conceput încât să nu lezeze endoteliul vascular (Fira-Mladinescu, 2002), de un traductor izometric de forţă prevăzut cu un micrometru manual de control al întinderii preparatului. Astfel susţinut, inelul vascular a fost introdus într-o baie de organ cu volumul de 10 ml al unei instalaţii BIOPAC MP 100 (BIOPAC System Inc, USA). Pentru menţinerea viabilităţii preparatului vascular pe toată perioada experimentului baia de organ a fost umplută cu soluţie viabilă Tyrode, termostatată la 37°C şi aerată continuu cu amestec carbogen (95 O_2 + 5 CO_2). Soluţia Tyrode folosită a avut următoarea compoziţie: NaCl 149,2 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, $NaHCO_3$ 11,9 mmol/l, $CaCl_2$ 1,8 mmol/l, $MgCl_2$ 0,5 mmol/l, NaH_2PO_4 0,4 mmol/l şi glucoză 5,5 mmol/l.

Datele de tensiune izometrică măsurate continuu cu ajutorul traductorului de forţă izometric FORT 10 (World Precision Instruments Inc.) au fost amplificate, achiziţionate şi stocate în memoria unui calculator cu ajutorul unei interfeţe hardware MP 100 şi a unui program software dedicat BIOPAC AcqKnowledge, versiune 3.7.2 (BIOPAC System Inc. USA).

Pentru echilibrare, preparatele vasculare au fost lăsate să se relaxeze la o forţă de pretensionare de 1,5 cN, timp de 60 de minute, iar soluţia tampon din baie a fost înlocuită la fiecare 20 minute. După această perioadă de echilibrare, a fost testată viabilitatea preparatului muscular neted prin obţinerea a 2 răspunsuri contractile similare induse de clorura de potasiu (KCl) în concentraţie de 70 mmol/l în baia de organ.

Înaintea fazei de testare cu 30 de minute

a fost adăugat în baia de organ indometacin 10^{-5} M, care a fost prezent şi în timpul experimentelor, pentru a elimina influenţa asupra tonusului vascular a produşilor derivaţi din acidul arahidonic pe calea ciclooxigenazei.

În cursul fazei de testare, pentru a aprecia relaxarea endotelial-dependentă, toate inelele au fost precontractate cu fenilefrină (PE 10^{-5} M) şi a fost urmărit răspunsul vasodilatator la doze cumulative (de la 10^{-9} M până la 10^{-4} M) de acetilcolină (ACh), respectiv de adenozin-difosfat (ADP), un alt agent relaxant NO-dependent. În finalul fazei de testare, pentru a examina vasodilataţia endotelial-independentă, a fost urmărită relaxarea preparatelor precontractate cu PE 10^{-5} M indusă de doze cumulative de nitroprusiat de sodiu (NPS de la 10^{-9} M până la 10^{-4} M), un agent vasomotor donor de NO.

Pentru a putea compara răspunsul vasodilatator al preparatelor vasculare, reducerea tonusului vascular indus de dozele cumulative de agenţi vasorelaxanţi a fost exprimată procentual din valoarea tensiunii dezvoltate de muşchiul neted vascular în cursul precontracţiei cu PE.

Răspunsul maxim a fost definit ca cea mai mare reducere a tonusului vascular ca răspuns la concentraţiile de agenţii vasodilatatori folosite în baia de organ. În scopul aprecierii globale a răspunsului vasomotor indus de diferite concentraţii a substanţelor vasodilatatoare, au fost calculaţi următorii parametrii: (i) concentraţia necesară atingerii a 50% din relaxarea maximă (EC_{50}), panta curbei doză-răspuns şi răspunsul maximal estimat, toate apreciate folosind ecuaţia lui Hill cu patru variabile; (ii) aria de sub curba doză-răspuns, utilizând ecuaţia lui Simpson de integrare numerică.

Prelucrarea statistică şi reprezentarea grafică a datelor a fost efectuată cu ajutorul programelor software Excel Microsoft Office 2003 (Microsoft Corporation) şi GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, SUA). Toate datele au fost exprimate ca medie ± deviaţie standard, obţinute din valorile de la n inele. Comparaţia statistică a mediilor între cele două loturile a fost făcută utilizând testul t-Student. Pentru comparaţia curbelor doze-răspuns, estimate cu ajutorul ecuaţiei lui Hill cu patru variabile, am folosit testul F. Am considerat că diferenţele sunt semnificative statistic când s-a obţinut un $p < 0,05$.

REZULTATE

Datele de reactivitate vasculară obţinute în cursul testării răspunsurilor vasodilatatoare cumulative sunt prezentate în tabelul I.

Răspunsul vasodilatator endotelial-dependent indus de acetilcolină (ACh) a fost redus semnificativ statistic la lotul expus la fum de ţigară comparativ cu lotul martor pentru concentraţiile mai mari de 10^{-6} M ACh în baia de organ, în timp ce cel indus de adenozin-difosfat (ADP) a fost mai redus doar la concentraţii mai mari de 10^{-5} M. Răspunsul vasodilatator endotelial-independent indus de nitroprusiatul de sodiu (NPS) în doze cumulative a fost asemănător la lotul expus cronic la fum de ţigară comparativ cu cel de control.

Aprecierea globală a reactivităţii preparatelor tisulare de arteră pulmonară de cobai s-a făcut cu ajutorul unor parametrii calculaţi a căror valoare pentru toate loturile de studiu este prezentată în tabelul II.

Deşi relaxarea maximă calculată cu ajutorul ecuaţiei lui Hill pare diferită între loturi pentru ACh, compararea statistică a curbelor doză-răspuns estimate, în funcţie de acest parametru, cu ajutorul testului F nu a fost posibilă. În cazul ADP-ului compararea statistică a curbelor doar pe baza relaxării maxime estimate a generat doar un p la limita semnificaţiei statistice ($p = 0,06$). În schimb, compararea statistică pe baza tuturor celor trei parametrii derivaţi a curbelor doză răspuns estimate cu ajutorul ecuaţiei lui Hill a arătat că la lotul expus la

TABELUL I

Date de reactivitate vasculară a inelelor de arteră pulmonară de cobai

	Lot expus la fum de ţigară (n = 5)	Lot control (n = 5)	P
Precontracţia indusă de PE 10^{-5} M			
cN	3,78 ± 0,87	4,14 ± 1,06	0,57
Relaxarea endotelial- dependentă indusă de doze cumulative de ACh (%)			
10^{-9}M	1,33 ± 2,27	2,95 ± 3,53	0,41
10^{-8}M	2,90 ± 5,15	6,45 ± 6,07	0,35
10^{-7}M	4,05 ± 4,41	12,98 ± 10,02	0,11
10^{-6}M	7,78 ± 4,76	27,28 ± 16,01	0,03
10^{-5}M	9,83 ± 4,36	39,77 ± 16,60	0,005
10^{-4}M	9,48 ± 3,10	40,99 ± 12,52	0,0006
Relaxarea endotelial- dependentă indusă de doze cumulative de ADP (%)			
10^{-9}M	3,55 ± 7,79	1,55 ± 1,66	0,59
10^{-8}M	3,32 ± 6,53	4,25 ± 4,29	0,80
10^{-7}M	8,10 ± 7,77	12,78 ± 10,92	0,46
10^{-6}M	23,81 ± 8,47	36,91 ± 17,94	0,18
10^{-5}M	36,64 ± 7,21	55,53 ± 13,51	0,02
10^{-4}M	36,00 ± 6,01	53,30 ± 15,40	0,047
Relaxarea endotelial- independentă indusă de doze cumulative de NPS (%)			
10^{-9}M	17,23 ± 34,31	3,89 ± 7,86	0,42
10^{-8}M	33,19 ± 35,23	30,40 ± 29,57	0,89
10^{-7}M	75,73 ± 11,38	56,16 ± 43,37	0,36
10^{-6}M	90,63 ± 6,20	80,02 ± 25,73	0,39
10^{-5}M	93,64 ± 5,99	94,38 ± 9,35	0,88
10^{-4}M	91,65 ± 5,62	96,38 ± 5,62	0,22

Notă: datele sunt prezentate ca şi medie ± deviaţie standard. PE = fenilefrină; ACh = acetilcolină; ADP = adenozin difosfat; NPS = nitroprusiat de sodiu

TABELUL II

Parametrii de apreciere globală a răspunsului vascular a preparatelor de arteră pulmonară de cobai la dozele cumulative de agenţi vasodilatatori

	Lot expus la fum de ţigară (n = 5)	Lot control (n = 5)	P
Parametrii derivaţi din ecuaţia lui Hill			
Relaxarea maximă (%)			
ACh	10,53 ± 5,69	44,29 ± 16,15	-
ADP	37,82 ± 6,51	56,13 ± 11,17	0,06
NPS	94,42 ± 14,37	97,88 ± 22,25	0,76
EC_{50} (–Log[M])			
ACh	6,86 ± 1,72	6,40 ± 1,00	0,81
ADP	6,32 ± 0,41	6,38 ± 0,48	0,86
NPS	7,76 ± 0,50	7,25 ± 0,72	0,18
Coeficient Hill			
ACh	0,45 ± 0,61	0,55 ± 0,51	0,88
ADP	0,81 ± 0,49	0,84 ± 0,62	0,89
NPS	0,70 ± 0,50	0,57 ± 0,45	0,66
Aria de sub curba doză-efect (unităţi de suprafaţă)			
ACh	569,40 ± 19,23	489,60 ± 57,06	0,02
ADP	505,50 ± 31,32	461,70 ± 49,09	0,13
NPS	238,10 ± 85,15	288,40 ± 110,90	0,44

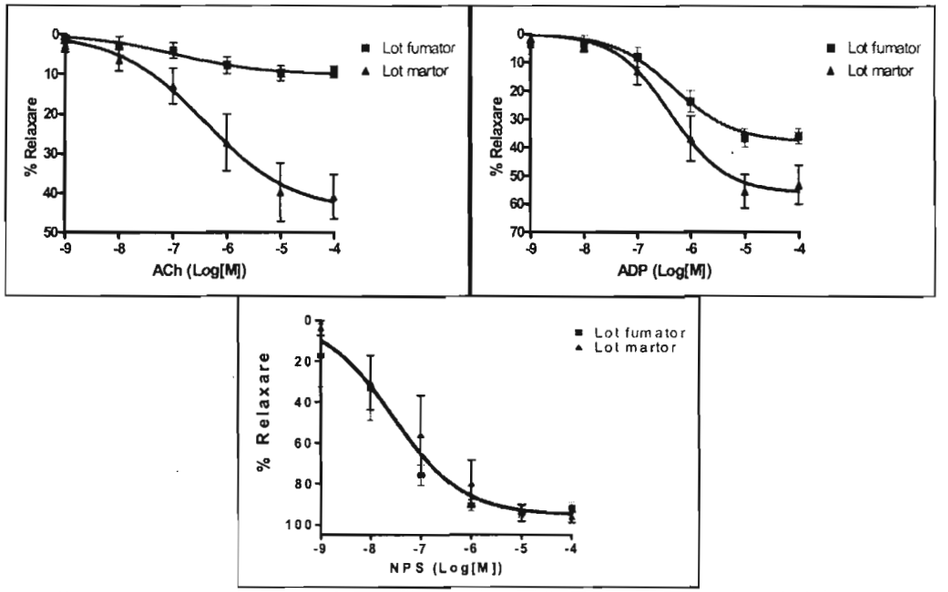


Fig. 1. Curbele doză-răspuns ale preparatelor de arteră pulmonară de cobai la administrarea cumulativă de acetilcolină (ACh), şi adenozin-difosfat (ADP), vasodilatatoare endotelial-dependent, respectiv nitroprusiat de sodiu (NPS), vasodilatator endotelial-dependent, estimate cu ajutorul ecuaţiei Hill cu patru variabile

fum de ţigară răspunsul endotelial-dependent a fost semnificativ mai redus ($p < 0,01$) atât pentru ACh, cât şi pentru ADP, în timp ce răspunsul endotelial-independent indus de NPS a fost identic (fig. 1).

Compararea ariilor de sub curba doză-răspuns a evidenţiat o diferenţă semnificativă statistic între loturile de studiu doar în cazul relaxării induse de ACh.

În figura 2 sunt prezentate înregistrări de lucru cu răspunsuri vasomotorii tipice, endotelial-dependente sau independente, de la ambele loturi de cobai.

DISCUŢII

Rezultatele noastre obţinute pe inelele de arteră pulmonară de cobai izolată în baie de organ au demonstrat că relaxarea endotelial-dependentă mediată prin eliberarea de NO sub acţiunea ACh sau ADP a fost diminuată la preparatele vasculare provenite de la animalele expuse cronic la fum de ţigară. Prezenţa permanentă în baie a indometacinului, un inhibitor potent al ciclooxigenazei şi al producţiei de prostaciclină (PGI_2), a exclus posibilitatea ca fumul de ţigară să inducă disfuncţia endotelială pulmonară prin deficitul de sinteză al PGI_2, un important factor vasodilatator endotelial-dependent. Mai mult, o afectare nespecifică a vasodilataţiei arterelor pulmonare indusă de expunerea cronică la fum de ţigară a cobailor este puţin probabilă deoarece răspunsul relaxant endotelial-independent la NPS nu a fost alterat.

Protocolul de expunere cronică la fum de ţigară utilizat de Wright et al. (2006) pentru a induce hipertensiune pulmonară la cobai este o adaptare a unuia mai vechi (Sekhon, 1994). Acesta a constat în fumarea a 7 ţigări/zi, 5 zile/săptămână, timp de 6 luni. Deoarece cantitatea de ţigări care a fost fumată săptămânal în cazul protocolului nostru, de doar 3 luni de expunere

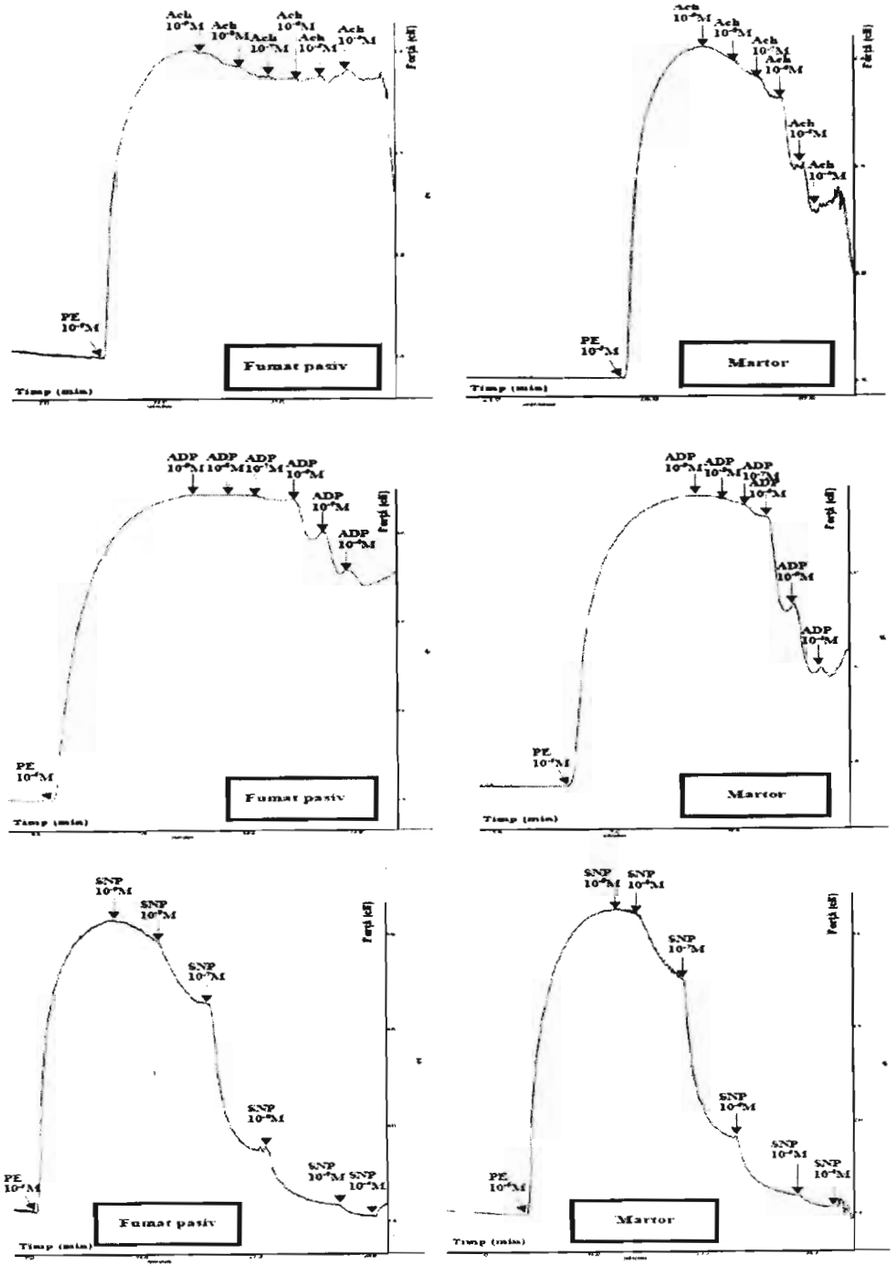


Fig. 2. Înregistrări de lucru cu profilul răspunsului vasodilatator indus de dozele cumulative de acetilcolină (ACh), adenozin-difosfat (ADP), respectiv nitroprusiat de sodiu (NPS) pe preparatele de arteră pulmonară de cobai precontractate cu fenilefrină (PE)

pasivă la fumul de ţigară, este similară cu cea a protocolului mai sus menţionat, putem considera că disfuncţia endotelială pulmonară indusă de fumat apare de timpuriu în cadrul leziunilor vasculare din BPOC.

Ca limitări ale studiului nostru, am menţiona în primul rând că am lucrat cu cobai de sex feminin, în condiţiile în care în studiile amintite că au evidenţiat anomalii vasculare pulmonare după o perioadă de expunere cronică la fumul de ţigară s-a lucrat cu cobai de sex masculin. Opţiunea noastră pentru cobai de sex feminin a fost condiţionată de lipsa cuştilor pentru animale, deoarece animalele de sex masculin ar fi trebuit ţinute câte unul într-o cuşcă. Totuşi, rezultatele noastre arată că şi la cobaii de sex feminin expunerea la fum de ţigară induce alterări vasculare pulmoanre. O altă limitare a studiului a fost lipsa unei evaluări histopatologice a plămânilor cobailor expuşi cronic la fum de ţigară, utilă pentru a putea stabili eventuala prezenţă a unor anomalii structurale de la nivelul arterelor pulmonare musculare, precum şi relaţia dintre alterările structurale şi cele funcţionale.

CONLUZIE

Studiul *in vitro a* funcţiei vasomotorii a arterelor pulmonare de la cobai expuşi cronic la fum de ţigară poate fi un model animal relevant şi reproductibil pentru studiul disfuncţiei endoteliale pulmonare din BPOC.

BIBLIOGRAFIE

1. Fira-Mladinescu O, Hancu M, Savoiu G. An experimental model for studing the vasomotor function of vascular endothelium on aortic ring from rat. *Medicina în evoluţie* 2002 ; 3 : 30-34.
2. Kessler R, Faller M, Weitzeblum G et al. „Natural history" of pulmonary hypertension in a series of 131 patients with chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 ; 164 : 219-224.
3. March TH, Barr EB, Finch GL et al. Cigarette smoke exposure produces more evidence of emphysema in B6C3FI mice than in F344 rats. *Toxicol Sci* 1999 ; 51 : 289-299.
4. Sekhon H, Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes rapid cell proliferation in small airways and associated pulmonary arteries. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 1994 ; 267 : L557-L563.
5. Unlu M, Fidan F, Sezer M. Effects of melatonin on the oxidant/antioxidant status and lung histopathology in rabbits exposed to cigarette smoke. *Respirol* 2006 ; 11 : 422-428.
6. Wright JL. The relationship of increased pulmonary artery pressure and airflow obstruction to emphysema. *J Appl Physiol* 1993 ; 74 : 1320-1324.
7. Wright JL, Churg A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD. *Chest* 2002 ; 122 : 301S-306S.
8. Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes physiologic and morphologic changes of emphysema in the guinea pig. *Am Rev Respir Dis* 1990 ; 142 : 1422-1428.
9. Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Am J Physiol* 2006 ; 292 : L125-L133.

CONSIDERAŢII ANATOMO-CLINICE ASUPRA BUTONULUI CELIO-MEZENTERIC

D. Păduraru[1], M. Zamfir[1], C.I. Stan[1], S. Luncă[2], L. Stoica[3], O.I. Motaş[1], Anca Indrei[4]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină
1 Catedra de Anatomie
Facultatea de Medicină Dentară
4 Disciplina de Anatomie şi Embriologie
Spitalul Clinic de Urgenţă "Sf. Ioan" Iaşi
2 Clinica de Chirurgie
Centrul de Cardiologie "G.I.M. Georgescu" Iaşi
3 Clinica de Chirurgie Cardio-vasculară

ANATOMO-CLINICAL CONSIDERATIONS ABOUT THE COELIO-MESENTERIC BUTTON (Abstract): **Aim**: This work points out the access ways - both the classical ones and the ones less known and used - to the origin and the first centimeters of the superior mesenteric artery (SMA), underlining the advantages and desadvantages of each of them. **Material and method**: Our work is based on dissection of 30 human bodies and 200 selective artheryographies. **Results**: There are two classical ways to acces the first part of SMA: interduodeno-pancreatic and the left thoraco-abdominal ways. **Conclusions**: An access way to the origin of the SMA is necessary for the revascularisation through different techniques of the visceral territory depending on the SMA, taking into account the fact that at this level we have the most frequent localization of the ateroma plaques, which leads to acute or chronic intestinal ischemia (manifest in the form of postprandial abdominal angorus). **Key words**: COELIO-MESENTERIC BUTTON, SUPERIOR MESENTERIC ARTERY

Originea arterei mezenterice superioare (AMS) este sub forma unei porţiuni mai dilatate numită infundibul, care se întinde pe 2-4 mm; în această zonă se formează plăcile de aterom, generând pierderea elasticităţii infundibulului şi micşorarea calibrului, cu apariţia insuficienţei circulatorii cronice şi a angorului abdominal (1).

Grupate pe un segment ce nu depăşeşte în medie 2 cm (cu extreme cuprinse între 0 cm – în cazul unui trunchi celio-mezenteric – şi 3 cm), orificiile primelor două colaterale viscerale mari ale aortei abdominale constituie ceea ce chirurgii numesc „butonul celio-mezenteric" (2) sau „butonul aortic".

MATERIAL ŞI METODĂ

Acest studiu se bazează pe disecţia a 30 de cadavre (formolizate şi proaspete) de ambele sexe, de vârste diferite şi pe analiza a 200 de arteriografii selective (fig. 1) ale primelor două colaterale viscerale ale aortei abdominale (trunchiul celiac - TC şi AMS) atât *in vivo* cât şi postmortem.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Butonul celio-mezenteric, care reuneşte ostiumurile celor două artere (fig. 2), a devenit pasajul obligatoriu pentru chirurgi în prelevarea şi transplantul viscerelor digestive (ficat, intestin subţire, dar mai ales

Fig. 1. Stenoză ostială a AMS

pancreas, care necesită abordarea simultană a celor două orificii vasculare). În plus, această regiune este importantă în chirurgia trunchiului celiac, în chirurgia de revascularizare mezenterică (3) sau în cea a anevrismelor aortice superioare.

Există două căi clasice de abord a primilor centimetri ai AMS (4):

a) calea interduodeno-pancreatică (fig. 3) care permite, după eliberarea şi tracţiunea în jos şi spre dreapta a flexurii duodeno-jejunale (cheia fiind secţionarea muşchiului lui Treitz), abordul feţelor anterioară şi laterală stângă ale AMS; totuşi accesul la primii centimetri ai arterei este dificil datorită: 1) prezenţei colateralelor pancreatico-duodenale şi jejunale; 2) prezenţei unei eventuale artere hepatice drepte cu origine în segmentul proximal al AMS; 3) prezenţei pancreasului şi profunzimii câmpului operator.

Cu toate aceste impedimente, o embolectomie sau o reimplantare în aorta infrarenală (5) sunt posibile, dar dificile tehnic;

b) calea toraco-abdominală stângă care comportă o toraco-freno-laparotomie în al VIII-lea spaţiu intercostal, cu decolarea blocului spleno-pancreatic; în acest caz AMS este abordată pe flancul stâng. Această cale

Fig. 2. Butonul celio-mezenteric

permite o expunere mai largă, dar este grevată de o morbiditate mai importantă.

Alte procedee folosite pentru abordul originii primelor două colaterale viscerale ale aortei abdominale sunt:

c) decolarea duodeno-pancreatică (manevra Kocher) care permite abordul cu uşurinţă a primelor două segmente ale AMS (6). Disecţia segmentului retropancreatic este facilitată de sărăcia ţesutului adipos periarterial. Această cale are mai multe avantaje: 1) descoperirea şi controlul unei eventuale artere hepatice cu origine din AMS sunt posibile deoarece această cale permite şi abordul lateral drept al AMS (7); 2) aorta poate fi disecată proximal şi distal faţă de originea AMS (incluzând astfel şi originea TC) pe o distanţă mai mare de 5 cm, făcând posibilă o clampare laterală şi conservarea fluxului renal; 3) pe această cale sunt posibile embolectomia AMS sau o

Fig. 3. Abordul clasic al originii AMS

reimplantare mezenterică. Concluzia este că abordul AMS prin decolare duodeno-pancreatică este mai simplu şi eficient comparativ cu primele două căi de abord;

d) calea transplexică subpancreatică stângă permite controlul ostiumului AMS (8); elementul important este existenţa constantă a unui plan de clivaj interaorticoplexal între faţa anterioară a aortei abdominale şi faţa dorsală a părţii stângi a plexului celiac. Riscul de denervare simpatică nu este decât unul teoretic deoarece secţionarea longitudinală nu interesează decât partea stângă a plexului, anastomozele dreapta-stânga fiind bine reprezentate. Această cale simplifică abordul celio-mezenteric; problema care se pune este de a localiza partea stângă a plexului. Pentru aceasta se utilizează două repere: fie se încearcă vizualizarea plexului deasupra venei renale stângi (planul de clivaj mergând de la marginea superioară a venei până la ligamentul arcuat median al diafragmului), fie se foloseşte ca reper vărsarea venei suprarenale stângi în vena renală, planul de secţiune fiind situat imediat intern de acest reper;

e) calea de abord retroperitoneală stângă este utilă în revascularizările aortice, digestive şi renale (9,10); permite abordul doar în porţiunea iniţială a AMS, fiind mai puţin folosită de chirurgi deşi prezintă multe avantaje comparativ cu abordul transperitoneal. Această cale este utilizată în general în tratamentul bolilor ocluzive limitate la orificiile arteriale. Prin expunerea excelentă a aortei suprarenale şi a ramurilor sale viscerale, metoda este indicată şi în cazul ischemiilor arteriale mezenterice, acute sau cronice. Orificiul AMS este pus în evidenţă luând ca reper pilierul stâng diafragmatic care va fi secţionat de-a lungul feţei postero-laterale a aortei, în majoritatea cazurilor, rinichiul stâng fiind tracţionat anterior şi medial.

f) calea transistmică (puţin sau deloc utilizată);

CONCLUZII

Decolarea duodeno-pancreatică este o cale mai simplă şi eficientă comparativ cu abordul prin cele două metode clasice.

Calea transplexică stângă simplifică abordul celio-mezenteric, folosind repere anatomice pentru descoperirea şi secţionarea planului de clivaj interaortico-plexal.

Abordul retroperitoneal, mai frecvent pe partea stângă, permite descoperirea AMS pe o lungime suficientă pentru a practica atât endarterectomia cât şi pontajul aorto-mezenteric; această cale prezintă multe avantaje faţă de abordul transperitoneal.

BIBLIOGRAFIE

1. Calderon M, Reul J, Gregoric D et al. Long-term results of the surgical management of symptomatic chronic intestinal ischemia. *J Cardiovasc Surg* 1992; 33: 723-728.
2. Brunet C, Moutardier V, Di Marino V. La région dite du „bouton coelio-mésentérique", étude anatomo-chirurgical. *J Chir* 1993; 2: 70-73.
3. Kieny R, Cinqualbre J, Batellier J, Wolf P. Chirurgie des vaisseaux digestifs, indications électives de révascularisation face a un syndrome évoquant une ischémie chronique de l'intestin gręle. *Ann Chir* 1991; 45: 199-208.
4. Păduraru D. *Studiul sistemic şi telomic al arterei mezenterice superioare - Teză de doctorat.* U.M.F. "Gr.T. Popa" Iaşi, 1997, 42-59.
5. Gentile A, Moneta G, Taylor L, Park T, Mc Connell D, Porter J. Isolated bypass to the superior mesenteric artery for intestinal ischemia. *Arch Surg* 1994; 129: 926-932.
6. Bonnichon P, Mignod J, Corlieu P, Aaron C, Yandza T, Chapnis Y. Abord de l'artère mésentérique supérieure par décollement duodéno-pancréatique. Etude anatomique et applications cliniques. *Ann Chir Vasc* 1986; 1: 505-508.
7. Borrelly J. Abord sus-mésocolique droit de l'artère mésentérique supérieure à son origine. *J Chir* 1973; 105: 167-170.
8. Di Marino V, Brunet C, Coppens R, Bonnoit J. Left subpancreatic transplexus exposure of the proximal abdominal aorta. *Surg Radiol Anat* 1996; 18: 167-172.
9. Darling C, Shah M, Chang B, Bock M, Leather P. Retroperitoneal approach for bilateral renal and visceral artery revascularization. *Am J Surg* 1994; 168: 148-151.
10. Sicard G, Reilly J. Abord rétropéritonéal de l'aorte et de ses branches: voie gauche. *Ann Chir Vasc* 1994; 8: 212-219.

NOUTĂŢI

SPERANŢE PENTRU COPIII CU BOALA MENKES

Boala Menkes este o afecţiune neurodegenerativă cauzată de mutaţii la nivelul genei care codifică transportul cuprului în organism (ATP7A), paraclinic identificându-se un nivel scăzut al enzimei β dopamin-hidrolază. Copiii sunt aparent sănătoşi la naştere, dar începând cu săptamâna a 8-a apar convulsiile, hipotonia, stoparea dezvoltării, decesul instalându-se în jurul vârstei de trei ani. Tratamentul precoce cu compuşi de cupru poate preveni îmbolnăvirea şi moartea, dar diagnosticul presimptomatic era dificil din cauza lipsei de specificitate şi sensibilitate ale testelor diagnostice. Începând cu mai 2005, un grup de cercetători (Pediatric Genetics, Program in Molecular Medicine, National Institute of Child Health and Human Development) au iniţiat un studiu care a avut ca şi obiective: 1. evaluarea utilităţii în diagnosticul precoce a analizei nivelului plasmatic al norepinefrinei, acidului dihidroxifenilacetic şi al dihidroxifenilglicolului; 2. posibilităţile terapeutice şi 3. efectele pe termen lung ale tratamentului instituit. Pentru analiza mutaţiilor genetice s-au folosit tehnici ca PCR analisys şi teste imunohistochimice. Din cei 81 din copii identificaţi ca fiind la risc, 46 au avut concentraţii plasmatice anormale ale compuşilor mai sus menţionaţi, indicând un nivel scăzut al β dopamin-hidrolazei şi demonstrând, în acelaşi timp, specificitatea lor în diagnosticul neonatal la bolii Menkes. Din cei 46 de copii 12 au fost trataţi precoce cu cupru, supravieţuirea la 4,5 ani fiind de 92%. Concluzionând putem spune că astăzi boala Menkes nu mai poate fi considerată fatală atât timp cât diagnosticul neonatal este accesibil şi terapia cu cupru este corect instituită (Kaler SG et al. Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N Eng J Med* 2008; 358 (6): 605-614).

Ecaterina Enache

THE ACCURACY OF ALVEOLAR CREST DIMENSIONS MEASUREMENT FOR DENTAL IMPLANTS. IN VITRO STUDY

Mihaela Hedeşiu[1], Cristiana Balog[2], Diana Monica Preda[3], G. Băciuţ[2], Mihaela Băciuţ[2], Floarea Fildan[1], Angela Pop[3], M. Maier[3]
"I. Haţieganu"University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca
School of Dental Medicine
1 Department of Oro-Maxillo-Facial Radiology
2 Department of Oro-Maxillo-Facial Surgery
3 Department of Odontology

THE ACCURACY OF ALVEOLAR CREST DIMENSIONS MEASUREMENT FOR DENTAL IMPLANTS. IN VITRO STUDY (Abstract): **Objectives**: The aim of this study was to evaluate the accuracy of radiological examination methods in quantitative preimplantar bone assessment. **Material and method**: The study was carried out on a dry cranium, totally edentate. There have been radiological appreciated the height of the alveolar process and its width, both to the maxilla and the mandible. Also, it has been established the distance between the free edge of the alveolar crest and the superior edge of the mandibular canal. The values radiological measured have then been compared with those obtained through direct measurement of these dimensions on the cranium. **Results**: The results were performed in tables and diagrams. The greatest deviation from the real values was at the panoramic radiography, while the computer tomography was the most accurate examination among the radiological techniques used in this study. The panoramic radiography doesn't give information about the alveolar crest thickness, about it's declivity and the alveolar crest measurement generates significant errors. Linear tomography implies a difficult technique, but it has the advantage of a low irradiation,a wider accessibility and a lower cost than the CT. Computer tomography is the most accurate preimplantar evaluation technique but it has the disadvantage of a high patient radiation. **Conclusions**: The panoramic radiography represents an insufficient method for appreciating the preimplantar bone status. That's why it has to be supplemented with other radiological examinations, especially at the cases with alveolar crest atrophy, to avoid accidental penetration of adjacent structures. **Key words**: DENTAL IMPLANT, PANORAMIC RADIOGRAPHY, COMPUTED TOMOGRAPHY, LINEAR TOMOGRAPHY

The preoperatory radiological evaluation for patients with dental implant prescription must establish with precision the alveolar crest dimensions and it's relation with the important anatomical elements that must be protected during the implant process (mandibular canal, nasal fossa, maxillar sinus, incisal orifice) (1). Also, it must evaluate the quality of the alveolar bone. The main radiological techniques used in the surgical practice are: panoramic radiography and linear tomography with longitudinal and transversal sections (2). These are completed by imagistic examinations: medical computer tomography, multimodal spiral tomography (Scanora) and cone beam volume tomography (CBCT).

With this writing we intended to study in vitro the accuracy of each of these examination methods, estimating the quantitative preimplantar bone offer. We will have in view the factors that influence the measurement precision and the finality of the study will be to establish the criteria that will be the basis of choosing the preimplantar radiological evaluation method.

MATERIAL AND METHOD

The study was carried out on a dry cranium, totally edentate bimaxillare.

There have been radiological appreciated (on the panoramic radiography, linear tomography with transversal sections - cross-section and CT) the height of the alveolar process and its width (vestibulo-oral dimension), both to the maxilla and the mandible. Also, it has been established the distance between the free edge of the alveolar crest and the superior edge of the mandibular canal. The values radiological measured have then been compared with those obtained through direct measurement of these dimensions on the cranium.

For materializing the preimplantar radiological model, there have been manufactured two acrylic guide model with gutta percha buckets that mark the site of the future implants (fig. 1).

There has been studied the dimension of the alveolar crest at the level of the incisors, premolars and molars, both for the upper and lower jaw. The canines have been considered having the same radiological behavior as the frontal teeth (3). The panoramic radiography has been accomplished with the Instrumentarium OP100- Finland, which has a 1.3 magnifying factor (fig. 2).

The linear tomography was realized with the same type of device. For performing the longitudinal and transversal sections, the dental arches were imprinted with a silicone material, in a special shape that the device is equipped with.

The imprint was then placed on a support, so that the devices crossing light beams would lie on the implant site. After that, the cranium was placed and was fixed so that there would be no movements during the exposure. There have been made three 3mm longitudinal and transversal sections at each implant site (fig. 3, 4). On the obtained cross-section sequences, the dimensions of the alveolar crest were measured with a corrected grid having a 1.4 magnifying factor.

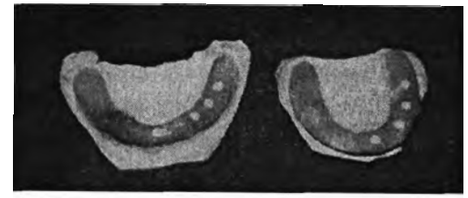


Fig. 1. Preimplantar acrylic guide model

Fig. 2. Preimplantar radiography with acrylic guide model -the radio opaque guide marks the implant site

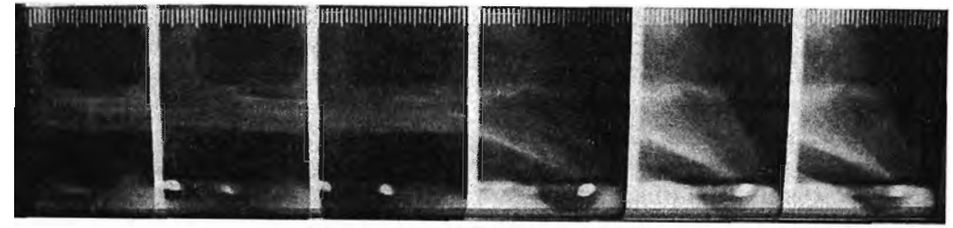


Fig. 3. Linear tomography: longitudinal sections

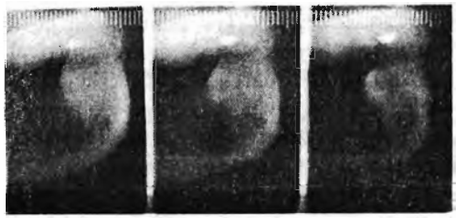


Fig. 4. Linear tomography : transversal sections

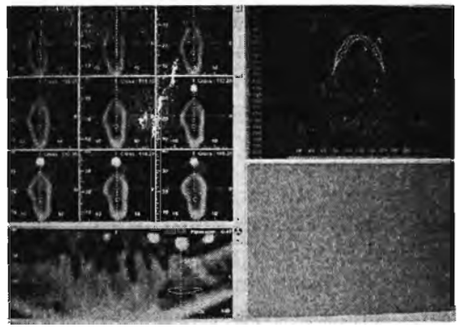


Fig. 5. Computed tomography examination

The CT examination (fig. 5) was carried out on a Picker device (General Electric) according to the following scanning protocol : the gantry declivity 0°, 2 mm collimation, contiguous axial sections, parallel with the oclusal plane, starting with the free edge of the cuspids till 2 mm under mandibular bazilar edge and 2 mm above the maxilla sinus floor. The images were saved to a CD in DICOM standard and transferred to a Toshiba computer were they were processed with specialized parallel plane reconstruction software on the dental arch curvature. The manner of image reconstruction started with selecting the axial image, which reproduces the greatest length of the dental arch and on which was manually marked a curve located equally distant between the two bone compacts, vestibular and oral. The software generated automatically the reconstructed sections in perpendicular plane on the traced curve and calibrated the dimensions (4).

The radiologicaly measured values were compared with those directly measured on the cranium. All dimensions were read by two investigators.

RESULTS

The results of the performed measurements were included in tables and diagrams that represent the radiological measurements deviation compared to the real values.

DISCUSSIONS

As it can be noticed from the tables the greatest deviation from the real values was at the panoramic radiography ($p=0,001$), while the computer tomography was the most accurate examination among the radiological techniques used by us in this study.

The measurement of the vertical dimension of the alveolar crest through panoramic radiography had a lower accuracy at the maxilla than the mandible, the error source being the image distortion and the projection of the nasal fosses and maxilla sinuses over the alveolar arch (5). Also, in the frontal area, the radio opacity of the palate hardened the exact measurement of the alveolar crest. At the mandible, the panoramic radiography proved itself to be more accurate comparative to the measurements performed with linear tomography with transversal sections (6). It has been noticed an increased deviation on the transversal sections at the level of the inferior molars generated specially by transcription errors of the guide marks on the upper

TABLE I

Examination	SI	SP	SM	II	IP	IM
Cranium	21.	17	11	25	23	20
Cross sect	21.5	18.5	12.25	25.5	24	23.5
CT	21.39	17.16	11.44	25.32	23.2	21
OPT	17	15	9	27.5	25	22

Where: S.I. - vertical dimension at superiors incisors (in mm); S.P. - vertical dimension at superiors premolars (in mm); S.M. - vertical dimension at superiors molars (in mm); I.I. - vertical dimension at inferiors incisors (in mm); I.P. - vertical dimemsion at inferiors premolars (in mm); I.M. - dimension at inferiors molars (in mm)

TABLE II

Examination	SI	SP	SM	II	IP	IM
Cranium	8	9	10	9	9	12
Cross-section	10	12	12.5	10.5	13.5	14.5
CT	9.84	10.59	12.59	9.67	11.13	13.79

Where: S.I. - vestibulo-oral dimension at superiors incisors (in mm); S.P. - vestibulo-oral dimension at superiors premolars (in mm); S.M.- vestibulo-oral dimension at superiors molars (in mm); I.I. - vestibulo-oral dimension at inferiors incisors (in mm); I.P. - vestibulo-oral dimension at inferiors premolars (in mm); I.M. - vestibulo-oral dimension at inferiors molars (in mm)

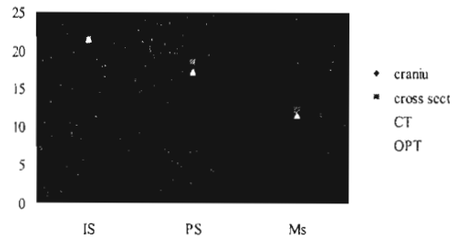


Fig. 6. The radiological measurements deviation for the superior jaw's vertical dimensions compared to the real values (cranium)

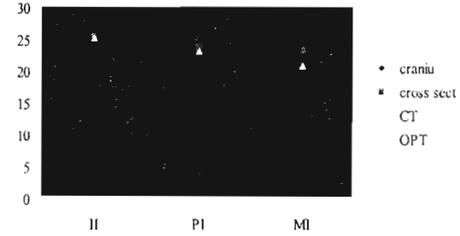


Fig. 7. The radiological measurements deviation for the inferior jaw's vertical dimensions compared to the real values (cranium)

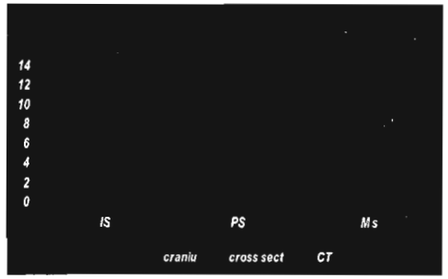


Fig. 8. The radiological measurements deviation for the superior jaw's vestibulo-oral dimensions compared to the real values (cranium)

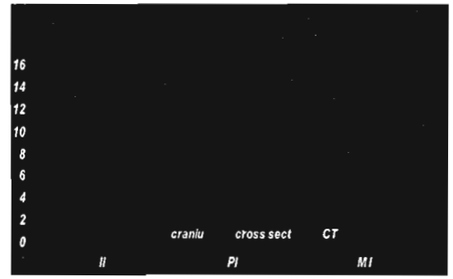


Fig. 9. The radiological measurements deviation for the inferior jaw's vestibulo-oral dimensions compared to the real values (cranium)

Fig. 10. Relation with mandible canal

model. As regards measuring the alveolar crest vestibulo-oral dimension, there have been established significant errors both in computer tomography and in linear tomography. On the transversal sections of the dental arch curvature, performed with panoramic radiography, the deviation was greater in the premolar area, considered the "frontals" area.

Computer tomography can generate errors in the following situations: (a) not respecting the scanning protocol - the declivity must obligatorily be 0° and the section thickness must be 1 mm, because the reconstruction program generates the results according to these values; (b) tracing the reconstruction curve - the reconstruction curve has to be traced manually at equal distance from both bone corticals; (c) patient moving during examination (7).

Regarding the relation with the mandibular canal, the greater errors turned up

on the transversal sections obtained with panoramic radiography, being generated by the low image resolution and the vague outline of the mandibular canal (8).

CONCLUSIONS

In conclusion we can say that the panoramic radiography, although it's a first choosing examination in oral implantology, it represents an insufficient method for appreciating the preimplantar bone status because it doesn't give information about the alveolar crest thickness, about it's declivity and the alveolar crest measurement generates significant errors (9). That's why it has to be supplemented with other radiological examinations, especially at the cases with alveolar crest atrophy, to avoid accidental penetration of adjacent structures (mandibular canal, maxilla sinuses, nasal fossa).

Linear tomography with transversal sections implies a difficult technique, laboriously, but it has the advantage of a low irradiation, a wider accessibility and a lower cost than the CT. The method is recommended for 1-3 implants (4). Computer tomography is the most accurate preimplantar evaluation technique but it has the disadvantage of a high patient irradiation (for a maxillary there are performed about 25 sections with a 1mm thickness). The artifacts generated by the metallic parts of prothetic restorations are another important shortcoming of this method. It is recommended especially to more than 3 implants and at the cases with ample alveolar crest atrophy (6). Perspectively, computer tomography will be replaced with dental volumetric tomography where it's being done a single acquisition of a volume between the external angle of the orbit and the base edge of the mandible and then the images are being multiplanary and 3D reconstructed. The accuracy of this method is superior to CT's and the patient irradiation it's comparable with that in a panoramic radiography.

An accurate radiological examination essentially contributes to the therapeutically success.

REFERENCES

1. Smith DE, Zarb GA. Criteria for success of osseointegrated dental implants. *J Prosthet Dent* 1989; 62: 67-72.
2. Jacobs R, Adriansens A, Naert J, Quirynen M, Hermans R, van Steenberghe D. Predictibility of reformatted computed tomography for pre-operative planning of endoseous implants, *Dentomaxillofac Radiol* 1999; 28: 37-41.
3. Hedeşiu M, Balog C, Băciuţ M et al. Indicaţiile examenului radiologic în implantologie. *Transilvania Stomatologică* 2003; 4: 31-38.
4. Miller C, Nummikoski PV, Barnett D. Cross-sectional tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 70: 791-797.
5. Beason RC, Brooks SL. Preoperative implant site assessment in Southeast Michigan. *J Dent Res* 2001; 80: 137-142.
6. Hanazawa T, Sano T, Seki K, Okano T. Radiologic measurements of the mandible: a comparison between CT-reformated and conventional tomographic images. *Clin Oral Impl Res* 2004; 15: 226-232.
7. Miles DA, van Dis ML. Implant radiology. *Dent Clin N Am* 1993; 37: 645-668.
8. Greenstein G, Tarnow D. The mental foramen and nerve: clinical and anatomical factors related to dental implant placement: a literature review. *J. Periodontol* 2006; 77 (12): 1933-1943.
9. Tyndall DA, Brooks SL. Selection criteria for dental implant site imaging: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 630-637.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

NOI METODE DE REABILITARE MORFO-FUNCŢIONALĂ ÎN DESPICĂTURILE LABIO-MAXILO-PALATINE

Lucia Hurubeanu[1], G. Băciuţ[1], H.-Fl. Zeilhofer[2], R. Sader[3], Mihaela Băciuţ[1], R.S. Campian[1], H. Rotaru[1], Cr. Dinu[1], S. Bran[1], Cr. Balog[1], Ondine Lucaciu[1], A. Şerbănescu[4], Claudia Corega[4], M. Corega[4], I. Moldovan[5]

Universitatea de Medicină şi Farmacie "I. Haţieganu" Cluj Napoca
Facultatea de Medicină Dentară
1 Clinica de Chirurgie Cranio-Maxilo-Facială
4 Clinica de Ortodonţie
University Hospital Basel
2 Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Johann Wolfgang Goethe University Frankfurt
3 Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Universitatea "Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca
5 Facultatea de Pshihologie şi Ştiinte ale educaţiei

NEW MORPHO-FUNCTIONAL REHABILITATION METHODS IN CLEFT LIP AND PALATE (Abstract): The interdisciplinary, complex therapeutic protocol of the cleft lip and palate patients, applied in the Clinic of Cranio-Maxilo-Facial Surgery of "I. Haţieganu" University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, involves the morphologic reconstruction as well as the functional rehabilitation. Functional rehabilitation is the aspect, which gives the esthetical, social and familial integration of the patient, offering good quality of life. **Method**: In the current study, a new method and concept of improving the phonetic function in the primary and secondary surgical steps, with the effect on muscle and bone, is presented. The new surgical techniques used comprise of the surgery of the levator veli palatini using the method designed by Sader, and bone distraction, during the same surgical procedure. The assessment of the phonetical results was performed using the NARSOM test. **Results**: Following up the results of the techniques mentioned above, we consider that they improve extremely well the morphological status, while giving a functional and physiological support to the patient. **Conclusion**: Thus, they offer optimal conditions for the future progress of functional rehabilitation using specific logopedic methods. **Key words**: CLEFT LIP, CLEFT PALATE, MORPHO-FUNCTIONAL REHABILITATION, PLASTIC SURGERY, LEVATOR VELI PALATINI MUSCLE

Reabilitarea morfologică şi cea funcţională reprezintă obiectivele tratamentului despicăturilor labio-maxilo-palatine, fapt esenţial pentru redarea unei calităţi corespunzătoare vieţii acestor pacienţi. Reuşita acestei reabilitări are influenţă atât asupra identităţii pacientului, cât şi asupra modului de percepere a sa în familie şi societate.

Pentru o reabilitare eficientă morfologică şi funcţională, conceptul nostru terapeutic reprezintă o muncă de echipă interdisciplinară largă care asistă pacientul şi familia acestuia pe o perioadă lungă de timp.

MATERIAL ŞI METODĂ

Studierea reabilitării morfo-funcţionale a fost efectuată pe un lot de 100 pacienţi cu forme diferite de despicături labio-maxilo-

palatinale trataţi şi dispensarizaţi în clinica noastră. Echipa terapeutică de care au beneficiat toţi pacienţii cu despicături labio-maxilo-palatine a fost una multidisciplinară care a cuprins: medic neonatolog, pediatru, medic anestezist şi de terapie intensivă, chirurg maxilo-facial, medic ortodont, logoped, psiholog, genetician, nutriţionist, medic stomatolog, tehnician dentar, fiziokinetoterapeut. Luarea în evidenţă a acestor pacienţi se face de la o vârsta cât mai mică, în primele zile după naştere, iar dispensarizarea lor durează până la maturitate, şi chiar mai mult dacă situaţia a necesitat-o.

Reabilitarea morfofuncţională se adresează atât elementelor anatomice afectate de malformaţia în cauză, cât şi tulburărilor funcţionale consecutive acesteia. Astfel, reabilitarea s-a adresat părţilor moi (tegumente, muşchi, mucoase, cicatrici), maxilarelor şi dinţilor, relaţiilor interdentare şi intermaxilare, iar o atenţie specială a fost acordată reabilitării fonetice şi psihologice.

Metodele de reabiliatre morfofuncţională s-au desfăşurat în etape succesive, obiectivul final fiind obţinerea unui aspect corespunzător, dar mai ales a unei funcţionalităţi normale. Acest obiectiv s-a realizat prin etapizarea cât mai eficientă a fazelor terapeutice, fiind în strânsă dependenţă de situaţia clinică a pacientului. În acest sens, reabilitarea morfofuncţională a debutat de la vârste mici, începând de la 1-2 luni prin tratament protetic preoperator, urmat fiind de reabilitare morfologică prin tratament chirurgical primar. Paralel cu aceste tratamente s-a efectuat miogimnastică şi terapia logopedică. Tratamentul ortodontic adresat arcadelor dentare şi relaţiilor intermaxilare a fost urmat de tratamentul chirurgical secundar. Tratamentul chirurgical secundar a constat din chirurgia ortognatică, precum şi din intervenţiile de ameliorare a vorbirii.

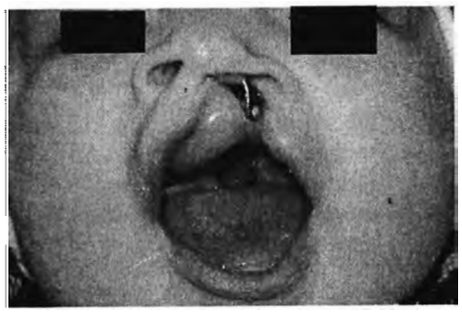


Fig. 1. Tratament protetic

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Tratamentul protetic preoperator a urmărit antrenarea funcţională a muşchilor velofaringieni şi ai limbii în vederea separării căilor aeriene superioare de cele digestive. De asemenea, columela a fost susţinută de pelota confecţionată pe plăcuţa palatinală (fig . 1).

Tratamentul chirurgical primar s-a urmărit a fi finalizat complet până la o vârstă cât mai mică (2, maximum 3 ani) pentru a putea oferi suportul morfologic reabilitării funcţionale fonetice şi respiratorii (fig. 2).

Prin plastia palatului s-a realizat separarea căilor aeriene de cele orale, dar cel mai important aspect al acestui moment chirurgical este reprezentat de calibrarea co-

Fig. 2. Rezultate ale tratamentului chirurgical primar

rectă a faringelui şi poziţionarea corectă a musculaturii velofaringiene. Dacă reabilitarea morfologică a segmentului anterior al despicăturii ofera suport reabilitării funcţiei fizionomice, corecta calibrare faringiană conferă suportul reabilitării fonetice, acest aspect fiind de importanţă majoră în reabilitarea completă şi de ansamblu a pacientului. Considerăm de importanţă majoră ca această calibrare sa fie făcută la vârstă cât mai mică, pentru a permite consolidarea unor reflexe musculo-fonetice cât mai corecte, începutul însuşirii aptitudinilor fonetice făcându-se astfel în condiţii optime.

Evaluarea rezultatelor funcţionale de etapă s-a facut cu ajutorul testului NARSOM:

N - nasalanţa de pronunţie a vocalelor şi consoanelor

A - articularea consoanelor

R - rezonanţa

S - sunetul vocii

O - insuficienţa oro-facială care urmăreşte habitusul respirator

M - mimica asociată

Tratamentul ortodontic nu întotdeauna poate rezolva problema relaţiilor intermaxilare şi nici chiar a celor interdentare, în funcţie de gravitatea disfuncţiilor, dar depinde şi de conştiinciozitatea pacientului şi a familiei acestuia în urmarea acestui tratament. În aceste situaţii, chirurgia secundară, ortodontică, este cea care poate soluţiona prin diferite tehnici disfuncţiile existente. Osteoplastia, GNE şi osteodisractionul aplicate la nivelul maxilarului superior au adus bune rezulate. În majoritatea cazurilor, când a fost necesară elongarea dirijată a maxilarului mai mult de 15 mm, am efectuat-o în etape succesive.

Din categoria intervenţiilor de ameliorare a vorbirii am utilizat o tehnică nouă, metoda Sader (1), care constă în *plastia muşchiului ridicător al vălului palatin*. Scopul acestei tehnici este deplasarea spre medial a peretelui lateral faringian şi tensionarea spre posterior a vălului palatin prin utilizarea muşchiului lung al capului (fig. 3 şi 4).

Aceasta metodă are rezultate funcţionale mult mai bune decât metodele utilizate anterior, cum ar fi de exemplu Sanvenero Rosselli, aceasta din urmă creând o punte permanentă, nefiziologică, în plan sagital la nivelul lumenului faringian. Metoda Sader are ca rezultat micşorarea calibrului faringian în mod concentric, fiziologic, fără a modifica anatomic nefiresc zona respectivă.

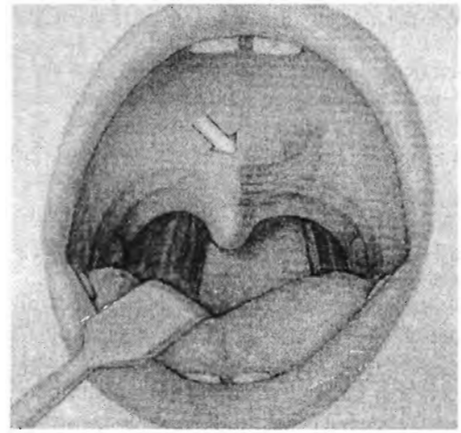


Fig. 3. Detalii de tehnică (după Sader)

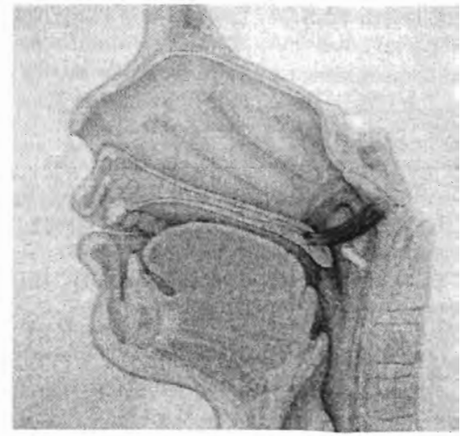


Fig. 4. Detalii de tehnică (după Sader)

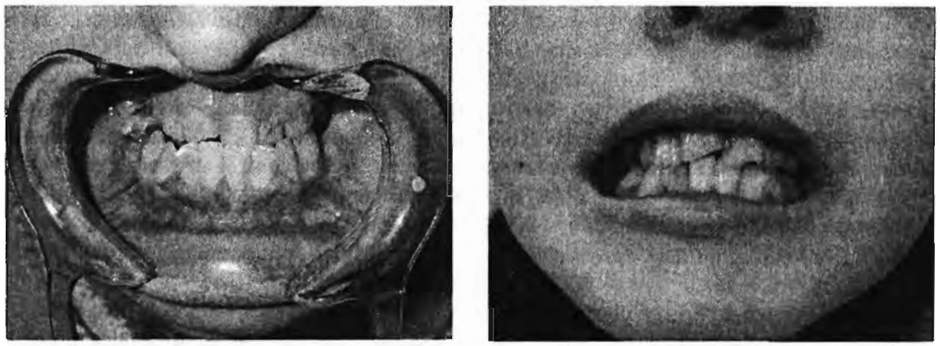


Fig. 5. Ocluzia pre- şi postoperator după osteodistraction maxilar

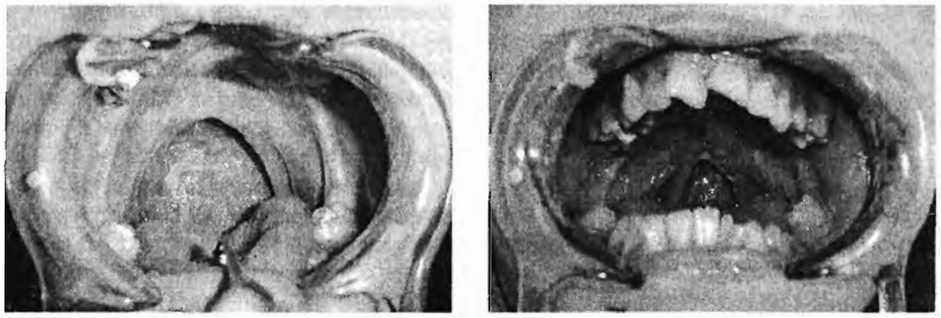


Fig. 6. Aspectul faringelui pre- şi postoperator după metoda Sader

O situaţie deosebită o reprezintă cazurile în care atât chirurgia ortognatică, cât şi cea de corectare a vorbirii trebuiesc efectuate în acelaşi timp chirurgical, în vederea ameliorării eficiente şi rapide a calităţii vieţii pacientului, grav alterate de tulburările funcţionale fonetice. Am efectuat acest tip de combinaţie de tehnici, la un caz de despicătură posterioară completă operată primar cu grave tulburări ale relaţiilor intermaxilare, la care tratamentul ortodontic nu a fost validat din motive socio-familiale. Rezultatele funcţionale au fost bune (fig. 5 şi 6), fiind susţinute şi de un tratament logopedic intens.

CONCLUZII

Tratamentul chirurgical primar de bună calitate, efectuat la vârste cât mai mici şi bine integrat în planul terapeutic complex interdisciplinar, reprezintă un suport valoros pentru reabilitarea funcţională a despicăturilor labio-maxilo-palatine.

Tehnica Sader de plastie a muşchiului ridicător al vălului palatin permite corectarea eficientă şi în condiţii fiziologice a deficienţelor de vorbire. Ea permite, de asemenea, asocierea cu elongarea dirijată maxilară (osteodistraction), nerezultând antagonisme şi compromiterea reciprocă a rezultatelor. Logopedia susţine şi stabilizează funcţional reabilitările morfologice. Controalele pe termen lung au scopul de a urmări stabilitatea rezultatelor obţinute.

Reabilitarea funcţională este elementul care determină, pe lângă cel estetic, posibilitatea pacientului de integrare în viaţa socială şi de familie, influenţând astfel percepţia propriei identităţi şi implicit ameliorarea calităţii vieţii.

BIBLIOGRAFIE

1. Sader R, Zeilhofer HF, Dietz M et al. Levatorplasty, a new technique to treat hypernasality : anatomical investigations and preliminary clinical results. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2001 ; 29 : 143-149.
2. Gaggl A, Schultes G, Feichtinger M, Santler G, Mossbock R, Karcher H. Differences in cephalometric and occlusal outcome of cleft palate patients regarding different surgical techniques. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2003 ; 31 : 20-26.
3. Horch HH. Lippen -Kiefer-Gaumenspalten. In : *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. vol. II. Munchen, Wien, Baltimore : Urban & Schwarzenberg, 1990, 3-85.
4. Kapetansky ID. *Techniques in Cleft Lip, Nose and Palate Reconstruction*. New-York : Gower Medical Publishing Ltd, 1987.

NOUTĂŢI

INCIDENŢA CANCERULUI LA FEMEILE CU SINDROM TURNER

Sindromul Turner este o boală cromosomică, dteerminată de monosomia completă sau parţială a cromosomului X şi are o incidenţă de 1/2.000 de nou-născuţi de sex feminin. Fenotipul este determinat de haploinsuficienţa genelor de pe cromosomul X care scapă inactivării din embriogeneză. Riscul pacientelor cu sindrom Turner de a face un cancer a fost puţin studiat. Există date care indică un risc crescut de apariţie a gonadoblastoamelor la pacientele cu mozaic cromosomic de tip 45,X/46,XY, precum şi studii care sugerează asocierea dintre monosomia X şi neuroblastoame în copilărie, respectiv cu cancer endometrial la pacientele care au utilizat pe perioade lungi de timp o terapie estro-progestativă de susbstituţie. Autorii au strâns datele de la 25 de centre citogenetice din Marea Britanie şi le-au raportat la Registrul central al Serviciului de Sănătate Naţională din Anglia (şi Ţara Galilor) şi Scoţia (*National Health Service Central Register* - NHSCR). Au fost luate în calcul toate pacientele diagnosticate citogenetic cu sindrom Turner în perioada ianuarie 1971 - iulie 2005, fiind identificate 4909 femei cu monosomie X. Din diverse motive (date insuficiente, emigrare, teste citogenetice neconcludente sau care au indicat asocierea monosomiei X cu o trisomie autosomală) au fost excluse 1484 femei. Datele citogenetice, ale celor 3425 de femei cu sindrom Turner incluse în studiu, au indicat următoarele aspecte : mozaic cromosomic - 1863 cazuri (54,4%) ; monosomie X omogenă - 1238 cazuri (36,2%) ; isocromosom X de braţ lung (46,X,i(Xq)) - 186 cazuri (5,4%) şi alte monosomii X parţiale - 132 de cazuri (3,9%). Coroborarea datelor citogenetice cu cele ale NHSCR au indicat prezenţa a 86 de tumori, dintre care 73 au fost maligne. Incidenţa globală a neoplaziilor a fost similară cu cea din populaţia generală. A fost identificat un risc crescut pentru cancere ale sistemului nervos central (în special tumori meningeale) ale vezicii urinare şi uretrei, respectiv ale vaginului şi vulvei. În schimb, riscul de cancer mamar a fost mai mic decât cel din populaţia generală. Raportat la tipul de anomalie cromosomică, a fost stabilită o corelaţie pozitivă între prezenţa monosomiei X omogene şi riscul de cancer al sistemului nervos central. De asemenea, a fost stabilit faptul că pacientele cu mozaic 45,X/46,XX au risc de cancer mamar asemănător cu cel din populaţia generală, în timp ce celălalte forme citogenetice de sindrom Turner se asociază cu un risc scăzut pentru această neoplazie. În concluzie, monosomia X nu se asociază cu un risc semnificativ pentru cancer, exceptând unele forme particulare de neoplazie (Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Cancer incidence in women with Turner syndrome in Great Britain : a national cohort study. *Lancet Oncol* 2008 ; 9 : 239-246).

E.V. Gorduza

STUDIU PRIVIND INFLUENŢA PARAMETRILOR TURNĂRII ALIAJELOR DENTARE ASUPRA PIESELOR PROTETICE METALICE

Anca Mihaela Viţalariu, Monica Silvia Tatarciuc
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Medicină Dentară
Catedra Tehnologia Protezelor Dentare

STUDY CONCERNING THE INFLUENCE OF THE CASTING PARAMETERS OF DENTAL ALLOYS ON THE CAST PROSTHETIC REHABILITATIONS (Abstract). The integration of a cast rehabilitation into the oral environment and its clinical longevity are mainly determined by the accuracy reproduction of the technological parameters. The aim of this study was to evaluate the structural defects induced by the modification of the technological conditions of casting the conventional and titanium alloys. **Material and method**: We used 35 cast prosthetic rehabilitations, divided into 7 groups. For each group we modified one parameter: the width of the wax pattern, the design and topography of the casting channels, the absence of the cleanliness of the wax pattern, the preparation of the investment material, the thermal system for the mold preparation and reduced quantity of metal used for casting. For the 7-th group, represented by titanium cast rehabilitations, we modified the design and dimensions of the casting channels. **Results**: The changes in the technological conditions induced porosity, incomplete frameworks or plusses on the prosthetic appliances. The fundamental theoretical knowledge of the clinician and dental technician and the strictly application of the technologies assure the premises of the satisfaction of the patient. **Key words**: DENTAL ALLOYS, CASTING PARAMETERS, CASTING ERRORS

Integrarea unei piese protetice turnate în echilibrul mediului oral, precum şi longevitatea sa clinică sunt în mod determinant condiţionate de respectarea cu stricteţe a parametrilor algoritmului tehnologic de realizare. Scopul lucrării a constat în evidenţierea erorilor care pot să apară la nivelul infrastructurilor metalice consecutiv eludării condiţiilor tehnologice specifice prelucrării aliajelor convenţionale şi a celor pe bază de titan.

MATERIAL ŞI METODĂ

Lotul de studiu a fost reprezentat de un număr de 35 lucrări protetice turnate din aliaje nenobile şi titan. Infrastructurile metalice au fost analizate macroscopic pentru decelarea defectelor survenite consecutiv parcurgerii etapelor de machetare, pregătire pentru ambalare, ambalare propriu-zisă, topire şi turnare a aliajului în tipar. Lucrările au fost împărţite în şapte grupe de câte cinci, studiindu-se pentru fiecare dintre acestea influenţa modificării unui anumit parametru tehnologic specific etapei de lucru.

Machetele scheletelor metalice au fost realizate din ceara albastră de inlay, pe modele de lucru cu bonturi mobilizabile, prin tehnica step by step. La cinci dintre acestea grosimea a fost diminuată sub valoarea de 0,4 mm (grupa 1).

Pregătirea pentru ambalare s-a realizat prin tehnica Heraeus, cu modificarea dimensiunilor, numărului şi dispoziţiei machetelor canalelor de turnare pentru cinci machete (grupa 2). Diametrul tijelor principale a fost crescut la 4mm iar numărul tijelor secundare a fost mărit faţă de cel necesar. În mod corect diametrul canalelor de turnare este realizat în funcţie de fluiditatea aliajului (2,5 - 3mm pentru aliajele nenobile) iar numărul lor este corelat cu amplitudinea piesei protetice. Este indicat ca tijele să se aplice cu o înclinaţie mai mare de 90° (120°-135°) pentru a se evita apariţia curenţilor turbionari (1).

În alte cinci cazuri (grupa 3) a fost eludată etapa de degresare a machetei, care este necesară asigurării aderenţei pastei de masă de ambalat pe suprafaţa machetei şi îndepărtării impurităţilor care ar putea fi incluse în aliaj modificându-i calităţile.

In etapa de ambalare propriu-zisă am modificat condiţiile de preparare şi introducere în tipar a maselor de ambalat specifice aliajelor utilizate pentru cinci din machetele analizate. Prepararea masei de ambalat a fost realizată prin spatulare manuală, cu modificarea proporţiei indicate pulbere-lichid (grupa 4). În mod corect se recomandă utilizarea unei seringi pentru dozarea lichidului iar amestecarea să se realizeze la vacuum-malaxor, până la obţinerea unei consistenţe cremoase.

În faza de tratament termic al tiparului a fost redus intervalul de preincălzire şi de asemenea temperatura de încălzire propriu-zisă pentru un grup de cinci machete (grupa 5). Aducerea tiparului la o temperatură apropiată de cea de topire a aliajului se realizează în vederea creării unei căi fierbinţi, care să permită accesul aliajului fluid în toate detaliile tiparului.

Importanţa respectării cantităţii optime de aliaj a fost subliniată prin reducerea gramajului utilizat la turnarea construcţiei protetice pentru un număr de cinci schelete (grupa 6). În mod normal se topeşte o cantitate de aliaj dublă sau aproape dublă faţă de greutatea viitoarei piese pentru a asigura un volum suficient pentru umplerea completă a tiparului.

O alta direcţie de analiză a fost reprezentată de studierea defectelor ce pot surveni în cazul nerespectării parametrilor specifici tehnologiilor moderne de prelucrare a aliajelor pe baza de titan. Firmele producătoare recomandă utilizarea unor canale de turnare scurte şi late, distribuite în mod echilibrat pentru fiecare element al machetei, care se fixează pe conul de turnare prefabricat, furnizat de firma producătoare a aliajului de titan. Această modalitate diferită de realizarea convenţională a sistemului de canale, asigură un drum cât mai scurt posibil pentru titanul topit, deoarece turnarea acestuia are loc într-un interval de timp extrem de scurt (2,3). În studiul realizat pregătirea machetei pentru ambalare a fost făcută conform tehnicii Heraeus, modificând distribuţia şi dimensiunile machetelor canalelor de turnare (grupa 7).

REZULTATE

În cazul primei grupe realizarea unor machete prea subţiri, a căror grosime nu a fost corelată cu fluiditatea aliajului din care s-a turnat scheletul metalic, a condus la obţinerea unor piese protetice cu lipsuri, reprezentate de margini cervicale discontinui şi goluri la nivelul pereţilor laterali (fig. 1).

În cadrul celei de-a doua grupe, nerespectarea standardelor privitoare la dimensiunile machetelor canalelor de turnare şi a dispoziţiei acestora, a antrenat obţinerea unor componente metalice incomplete (fig. 2).

În cazul celei de-a treia grupe, eliminarea etapei de degresare a machetei s-a soldat cu lipsa de aderenţă a masei de ambalat la suprafaţa acesteia, materializată în apariţia plusurilor, evidente atât pe suprafaţa piesei protetice cât şi pe suprafaţa canalelor de turnare (fig. 3).

Obţinerea unei infrastructuri metalice care să reproducă cu fidelitate toate deta-

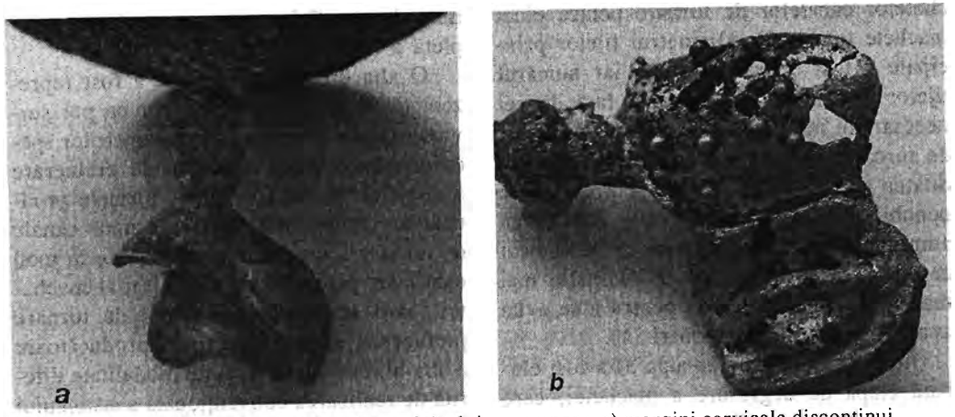


Fig. 1. O machetă prea subţire determină obţinerea unor : a) margini cervicale discontinui, b) goluri la nivelul pereţilor laterali

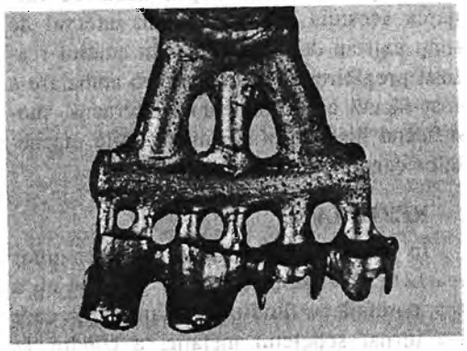


Fig. 2. Canalele de turnare prea multe şi prea groase au ca efect obţinerea unor piese turnate incomplete

Fig. 3. Plusurile apărute pe suprafaţa piesei turnate sunt cauzate de eliminarea etapei de degresare a machetei

Fig. 4. Lipsurile din piesa turnată sunt cauzate de masa de ambalat cu consistenţă moale (lichid in exces)

liile machetei, corect realizate, este condiţionată şi de respectarea cu stricteţe a etapei de ambalare propriu-zise. Nerespectarea indicaţiilor producătorului referitoare la proporţia pulbere-lichid, componente ale masei de ambalat, în sensul creşterii cantităţii de lichid, a determinat în cadrul grupei a patra obţinerea unei paste de masă de ambalat cu o fluiditate prea mare, ceea ce a antrenat lipsuri la nivelul piesei protetice finale (fig. 4).

În cazul celei de-a cincea grupe, încălzirea prea rapidă a tiparului a indus instalarea unui stres termic la nivelul pereţilor, având ca rezultat fracturarea sa. Nerespectarea regimului termic prin neatingerea tem-

Fig. 5. Introducerea aliajului într-un tipar insuficient încălzit duce la obţinerea unor schelete incomplete

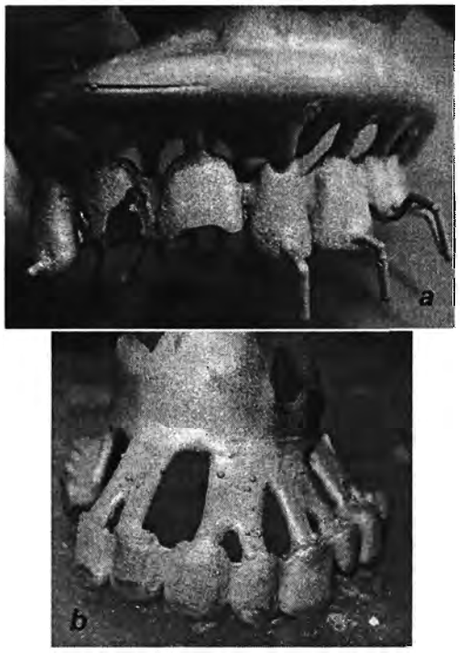


Fig. 6. a) Schelet din titan cu lipsuri cauzate de realizarea unui sistem de tije incorect, b) Schelet din titan la care sistemul de tije de turnare a fost realizat corect

peraturii maxime necesare curgerii aliajului determină obţinerea unor piese protetice deficitare, prin prezenţa lipsurilor sau a striurilor de scurgere. Acelaşi lucru poate fi semnalat şi în situaţia în care tiparul a fost corect încălzit dar s-a întârziat momentul turnării aliajului topit (fig. 5).

Pentru turnarea lucrărilor protetice din cadrul grupei a şasea s-a utilizat o cantitate insuficientă de aliaj dentar, iar rezultatul a constat în obţinerea unor restaurări metalice cu feţe ocluzale incomplete, deoarece tiparul nu a putut fi complet umplut.

În ceea ce priveşte realizarea pieselor turnate din titan (grupa 7), am obţinut structuri metalice incomplete, cu lipsuri atât la nivelul marginilor cervicale cât şi a pereţilor laterali (fig. 6a), induse de nerespectarea designului sistemului de tije de turnare specific titanului (fig. 6b).

DISCUŢII

Dimensionarea corectă a machetelor pieselor protetice şi corelarea cu fluidatea aliajului sunt condiţii esenţiale în obţinerea unei infrastructuri optime. Ca direcţie de aplicabilitate practică se impune utilizarea de machete prefabricate cu grosime uniformă, care permit reducerea consumului de aliaj şi obţinererea unor piese cu grosime dirijată.

În cazul utilizării unui design necorespunzător al canalelor de turnare, există riscul ca în structura piesei turnate să apară porozităţi de contracţie. În procesul de trecere a aliajelor dentare de la starea lichidă la cea solidă, se produce o contracţie volumetrică. Reducerea de volum care însoţeşte acest fenomen poate să genereze formarea porozităţilor de contracţie, ce se evidenţiază în mod special în zonele în care solidificarea aliajului s-a facut mai târziu (4). Conceperea şi utilizarea unor tije cu dimensiuni şi poziţionare corecte reduc riscul apariţiei porozităţilor de contracţie în piesa protetică, acestea putând fi prezente numai la nivelul sistemului de tije, la nivelul căruia aliajul se va solidifica mai târziu decât în piesa protetică (5). O altă deficienţă semnalată în practică este reprezentată de formarea suprafeţelor rugoase, atât pe suprafaţa tijelor de turnare cât şi a pieselor turnate.

Apariţia plusurilor de formă sferică pe suprafaţa infrastructurii metalice este determinată de modificarea intimă a masei de ambalat pe suprafaţa machetei nedegresate. Lichidul din constituţia pastei de masa de ambalat îşi măreşte tensiunea superficială la contactul cu acizii graşi din structura cerii machetei. Masa de ambalat cu tensiunea superficială crescută are tendinţa de a se strânge in picături în loc să se întindă pe suprafaţa machetei. Intre cele două suprafeţe se crează microcavităţi sferice de aer în care intră aliajul topit (6). Formarea plusurilor are impact practic deosebit în special în cazul aliajelor nobile, deoarece determină creşterea nejustificată a consumului de aliaj şi implicit a preţului de cost al lucrării protetice. In plus, etapa de prelucrare mecanică va fi mai dificilă şi cronofagă, eludând principiul ergonomic de tratament.

Prepararea corectă a masei de ambalat presupune atât respectarea proporţiei pulbere-lichid cât şi utilizarea vacuum-malaxorului, care permite obţinerea unei consistenţe optime, fără incluziuni de aer. Utilizarea unei mase de ambalat nespecifice poate determina apariţia de cruste pe suprafaţa tiparului, produse prin expansiunea cuarţului în interiorul masei de ambalat. Acestea sunt absorbite în aliajul topit, ajungând în final la suprafaţa piesei protetice, care devine rugoasă (7).

Pregătirea termică corespunzătoare a tiparului are ca scop crearea unor condiţii optime curgerii aliajului topit şi umplerii tuturor detaliilor tiparului. În situaţia în care încălzirea tiparului nu se realizează până la temperatura maximă admisă, aliajul se poate solidifica înainte de a parcurge traseul specific designului tiparului, rezultând piese turnate incomplete, cu lipsuri şi goluri.

Cantitatea de aliaj necesară trebuie calculată astfel încât după solidificare să umple cavitatea ce constă în piesa de turnare şi sistemul de canale. Cantitatea necesară pentru umplerea completă a tiparului şi obţinerea unei piese protetice corespunzătoare se calculează înmulţind greutatea cerii machetei şi a tijei de turnare cu densitatea aliajului (8).

Tehnologia titanului impune rigori deosebite, atât în etapa de pregătire pentru ambalare, cât şi în etapa de topire şi turnare a aliajului. Calităţile superioare demonstrate impun utilizarea titanului şi a aliajelor sale pe o scară din ce în ce mai largă în practica stomatologică. Din acest motiv devine necesară acumularea de informaţii atât clinice cât şi tehnologice utile în atingerea performanţei profesionale. Algoritmul de prelucrare a titanului se individualizează printr-o serie de particularităţi tehnologice care trebuie repectate cu stricteţe: machetele trebuie să fie uşor supraconturate la nivel cervical iar grosimea lor nu trebuie să fie mai mică de 0,5 mm întrucât curgerea topiturii este dificilă şi incertă în spaţii de dimensiuni mai reduse decât această valoare; canalele de turnare trebuie să fie scurte şi groase pentru a a sigura pătrunderea aliajului topit în tipar într-un timp extrem de scurt; masa de ambalat este specifică numai titanului şi aliajelor sale; topirea şi trunarea se realizează în cuptoare speciale, total programabile (9,10).

CONCLUZII

Obţinerea unei piese protetice turnate perfect adaptate şi concordante din punct de vedere biologic şi biomecanic, este condiţionată de cunoaşterea şi respectarea parametrilor tehnologici ce intervin în algoritmul specific de realizare. Defectele decelabile la nivel macroscopic reprezentate de plusuri sau lipsuri survin ca urmare a modificărilor regimului de lucru sau a particularităţilor de tehnică specifice fiecărei etape.

Acurateţea pieselor turnate din titan depinde în mod esenţial de rigurozitatea respectării tehnicii de realizare a tiparelor şi a

condiţiilor de topire şi turnare.

Acceptul clinic şi longevitatea restaurării protetice trebuie să reprezinte targetul primordial care să motiveze atât medicul cât şi tehnicianul dentar în parcurgerea demersului terapeutic.

BIBLIOGRAFIE

1. Tatarciuc M. *Tehnologia protezelor dentare fixe plurale*. Iaşi: Casa de editură Venus, 2004.
2. Shimizu H et al. Mold filling of titanium alloys in two different wedge-shaped molds. *Biomaterials* 2002; 23 (II): 2275-2281.
3. Ferenczi AM, Demri B, Moritz M, Muster D. Casted titanium for dental applications: an XPS and SEM study. *Biomaterials* 1998; 19 (16): 1513-1515.
4. Bratu D, Nussbaum R. *Bazele clinice şi tehnice ale ale protezării fixe*. Timişoara: Ed. Signata, 2001.
5. Compagni R, Faucher R, Youdelis R. Effects of sprue design, casting machine and heat source on casting porosity. *J Prosthet Dent* 1984; 52: 41-45.
6. Pătrăşcu I. *Tehnologia aliajelor dentare*. Bucureşti: Ed. Libripress, 2002.
7. Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13 (1): 71-84.
8. Craig RG. *Materiale dentare restaurative*. Bucureşti: Ed. All Educational, 2001.
9. Ho WF, Ju CP, Chern Lin JN. Structure and properties of cast binary Ti-Mo alloys. *Biomaterials* 1999; 20 (22): 2115-2122.
10. Takahashi M, Kikuchi M, Takadai Y, Okabe T, Okuno O. Electrochemical behavior of cast Ti-Ag alloys. *Dent Mater J* 2006; 25 (3): 516-523.

NOUTĂŢI

DETECŢIA GENOTIPURILOR CU RISC ÎNALT PENTRU HPV

Scopul studiului a fost de a evalua fezabilitatea testului Roche AMPLICOR MWP HPV de a detecta Human Papiloma Virus (HPV) în rândul femeilor cu citologie normală şi anormală. Am comparat prevalenţa genotipurilor HR HPV (genotipuri cu risc înalt), utilizând tehnicile AMPLICOR şi Hybrid Capture II, testând 470 produse cervicale, dintre care: 55 probe au fost cu citolologie normală, 208 ASC-US, 193 LGSIL si 14 HGSIL. Probele discordante au fost retestate prin metoda INNO LiPA HPV Test v2. Pentru probele cu citolologie normală, pozitivitatea a fost similară (21.8%), utilizând AMPLICOR si HC II. În cazul ASCUS pozitivitatea a fost 42.3% pentru ambele teste; în LGSIL, pozitivitatea pentu HPV a fost 66.3% pentru AMPLOCOR si 66.8% pentru HCII. În cazul HGSIL, rezultatele au fost 92.8% pentru AMPLICOR si 85.7% pentru HCII. Coeficientul Kappa a avut o valoare de 0.92 iar comparaţia între teste a fost de 96.2%. 18 cazuri au fost discordante: 9 au fost identificate ca fiind pozitive prin HC II si negative prin AMPLICOR. INNO LiPPA a confirmat pozitivitatea în toate cazurile. Interesant a fost faptul că toate probele testate prin HC II si AMPLICOR au fost pozitive şi pentru HPV 33. 8 paciente au fost diagnosticate ca fiind multiplu infectate cu HPV 16 sau HPV 18 sau HPV 56. Mai mult, două dintre acestea au fost coinfectate cu HPV 6 si HPV 54. Utilizând HR HPV de consens ca referinţă pentru pozitivitatea HPV, sensibilitatea (96.6%) şi specificitatea (100%) AMPLICOR au fost similare cu cele ale testului HC II. Testul AMPLICOR este un test sensibil, specific şi util pentru detectarea de rutină a HPV. (Mo LZ, Monnier-Benoit S, Kantelip B et al. Comparison of AMPLICOR(R) and Hybrid Capture II(R) assays for high risk HPV detection in normal and abnormal liquid-based cytology: Use of INNO-LiPA Genotyping assay to screen the discordant results. *J Clin Virol* 2007; 22: 2-10).

Ramona Ursu

TRATAMENTUL COMBINAT CHIRURGICAL-ORTODONTIC LA UN PACIENT CU O ANOMALIE ANGLE CLASA II/1 PREZENTARE DE CAZ

Claudia Corega[1], Mihaela Băciuţ[2], M. Corega[1], A. Şerbănescu[1], G. Băciuţ[2], S. Bran[2], C. Dinu[2], H. Rotaru[2]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "I. Haţieganu" Cluj-Napoca
Facultatea de Medicină Dentară
1 Clinica de Ortodonţie
2 Clinica de Chirurgie Cranio-maxilo-facială

A COMBINED SURGICAL-ORTHODONTIC APPROACH OF A CLASS II/1 MALOCCLUSION. A CASE REPORT (Abstract): This case report highlights the possibility of a nonextraction orthodontic treatment, surgically assisted, in a Class II Division 1 malocclusions in order to reduce maxillary protrusion prior to the surgical advancement of the mandible for the correction of the skeletal deficiency. The combined orthodontic-surgical approach optimizes the profile while allowing the settling of a Angle Class I occlusion at the end of the entire treatment sequence. **Key words**: CLASS II DIVISION 1 MALOCCLUSION, COMBINED SURGICAL ORTHODONTIC APROACH

În anomaliile de clasă II/1 Angle, care necesită tratament chirurgical pentru corectarea unui deficit scheletal intermaxilar sever, este necesar ca tratamentul ortodontic prechirurgical de aliniere a arcadelor să se realizeze conservativ, lucru extrem de dificil datorită deficitului scheletal transversal sever prezent la majoritatea pacienţilor. Acest concept nonextracţional reduce substanţial şi timpul de tratament prechirurgical şi evită retruzia buzei superioare, modificare cu impact negativ asupra profilului cutanat care ar impune ulterior o avansare chirurgicală a maxilarului superior. Dacă tratamentul arcadei superioare este nonextracţional, avansarea mandibulei prin osteotomie bilaterală sagitală este suficientă pentru corectarea deficitului scheletal şi obţinerea unui profil armonios (1,2).

Pacientul J.B., în vârstă de 17 ani şi 9 luni s-a prezentat pentru tratament ortodontic din motive fizionomice, fiind deranjat de protruzia incisivilor superiori.

Din anamneză subliniem obiceiul vicios de sugere a degetului prelungit până la vârsta de 6 ani.

Examenul facial a evidenţiat prezenţa unei asimetrii faciale moderate datorată devierii stânga a mentonului, o distanţă interalară crescută (33 mm) faţă de distanţa intercantală (24 mm), o uşoară asimetrie auriculară în sens vertical, regiunea paranazală normal conturată, prezenţa unei buze superioare de aspect şi coloraţie normală cu respectarea proporţiei între lungimea buzei şi a roşului buzelor (17, respectiv 9 mm), buza inferioară uşor răsfrântă cu o uşoară contracţie a muşchiului mentalis şi şanţul labiomentonier accentuar. Înălţimea facială inferioară este uşor diminuată (raport etaj mijlociu: etaj inferior 60 mm: 55 mm). Examenul din normă laterală evidenţiază un profil convex cu un unghi naso-frontal de 135 grade, un unghi nasolabial crescut

uşor (95 grade), o proiecţie anterioară normală a nasului, raportul între distanţele labiale superior-subnasale/subnasale-vârful nasului relativ normal (0,98), raportul buzelor în treaptă pozitivă cu o buză superioară poziţionată normal în câmpul de profil asociată cu o poziţie posterioară a mentonului, unghiul goniac de 121°, corpul mandibulei având o oblicitate normală. Regiunea submandibulară are o lungime medie, fiind uşor aplatizată (fig. 1). Incompetenţa labială prezentă este moderată.

La examenul endooral sunt prezenţi toţi dinţii permanenţi, cu excepţia lui 35, cu leziuni odontale multiple parţial tratate şi depozite de placă bacteriană consecutive unei igiene orale deficitare.

Arcada superioară are formă de V, fiind îngustată asimetric la nivel premolar cu malpoziţii dentare multiple şi denivelarea planului ocluzal prin suprapoziţia cuspizilor palatinali ai lui 14, 15, respectiv 24, 25 şi infrapoziţia grupului frontal superior. În arcada inferioară de formă parabolică sunt prezente rotaţii multiple şi suprapoziţia grupului frontal (fig. 2).

Examenul ocluziei a evidenţiat:
- overjet de 10 mm
- overbite de 2 mm
- o falsă deviere a liniei interincisive

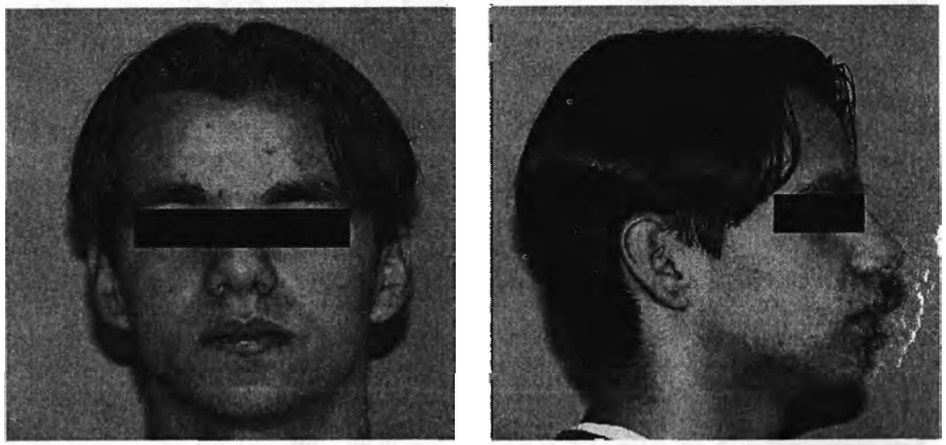


Fig. 1. Aspectul facial frontal şi profil

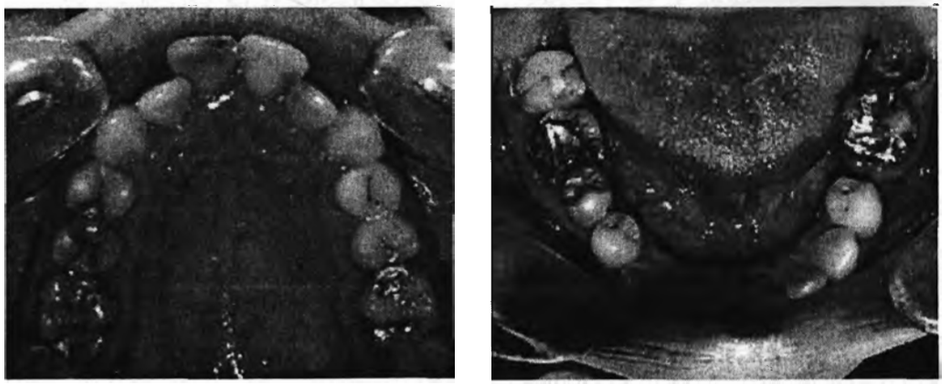


Fig. 2. Aspectul arcadelor

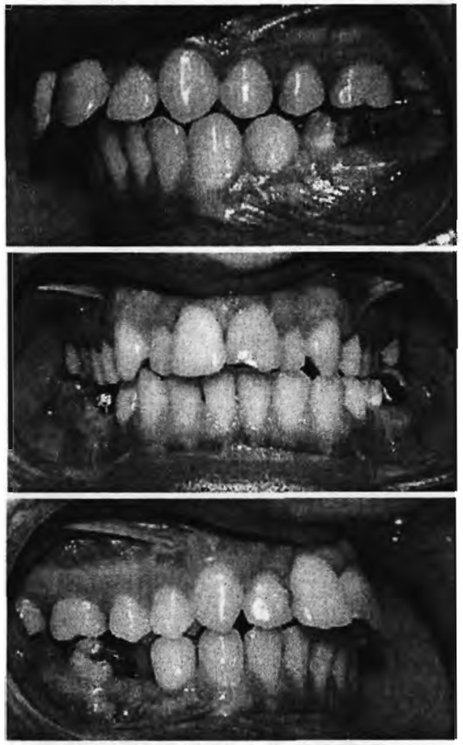


Fig. 3. Relaţiile de ocluzie

inferioare spre stânga datorită devierii liniei interincisive superioare cu 1,5 mm spre dreapta (fig. 3)

- rapoarte de distalizare de 1/2 cuspid în hemiarcada dreaptă şi de 1 cuspid în stânga.

Se evidenţiează o hipertonie a buzei inferioare şi multiple interferenţe pasive în propulsie. Propulsia mandibulei avantajează fizionomia, dar apar relaţii de ocluzie încrucişată bilateral.

Studiul de model a evidenţiat:

- în arcada superioară un deficit de spaţiu de 10 mm, iar perimetria corectată un deficit de spaţiu de 14 mm
- Indicele Pont - IP=-10 mm; IM=- 6 mm
- în arcada inferioară un deficit de 4 mm.

Indicele Bolton are valoare normală de 78,2%.

Fig. 4. Teleradiografia de profil la începutul tratamentului

La analiza teleradiografiei de profil (fig. 4) se observă:

- SNA=84°,
- SNB=78°,
- indicele Witts are o valoare pozitivă de 6 mm, confirmând un tipar scheletal de clasa II
- unghiul NS-NSL=7,5°
- normodivergenţa bazelor osoase este susţinută de valoarea unghiului ML-NSL =33,5°,
- unghiul ML-NL=22,4°
- NSBa=134,2°
- IMPA=91° se încadrează în intervalul normal
- unghiul I sup-NL =120°, iar poziţia lor este de 9 mm anterior faţă de perpendiculara McNamara

Diagnosticul ortodontic morfologic, stabilit pe baza datelor examenului clinic şi a criteriilor de evaluare mai sus-menţionate a fost de anomalie clasa II/1 Angle şi DDM maxilar cu înghesuire.

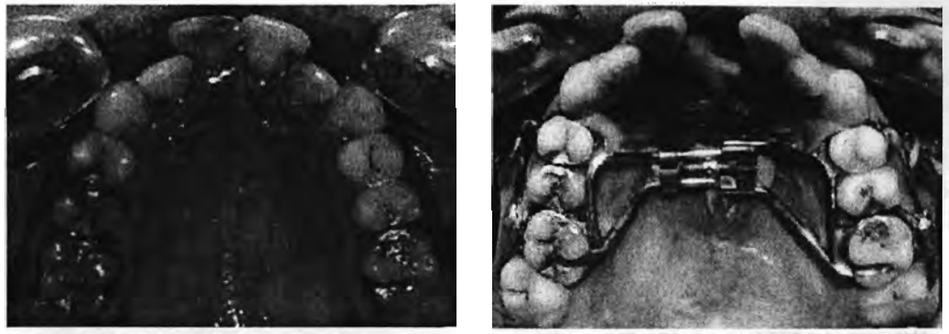


Fig. 5. Aspectul clinic al arcadei maxilare înainte şi după expansiunea palatină asistată chirurgical

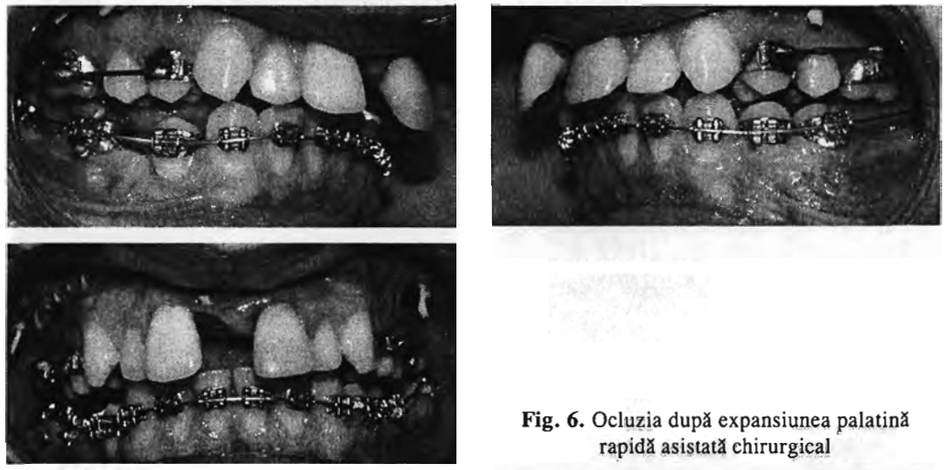


Fig. 6. Ocluzia după expansiunea palatină rapidă asistată chirurgical

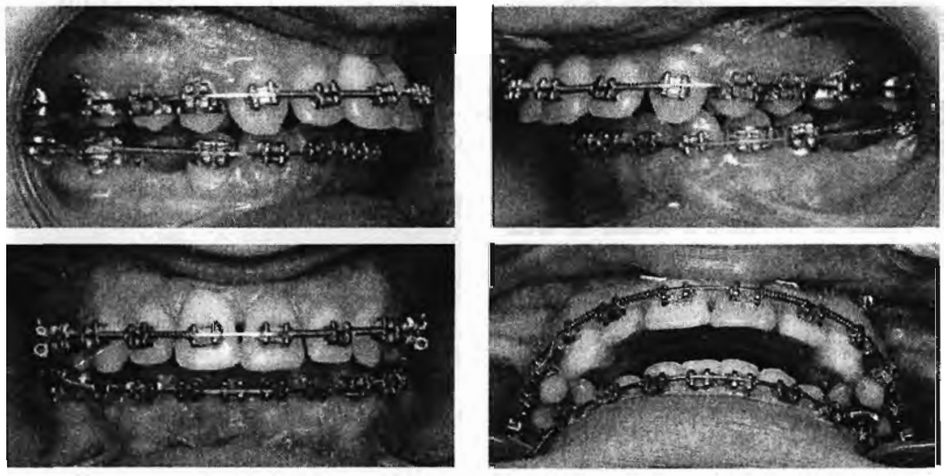


Fig. 7. Aspectul ocluziei preoperator

Fig. 8. Profilul pre- şi postoperator

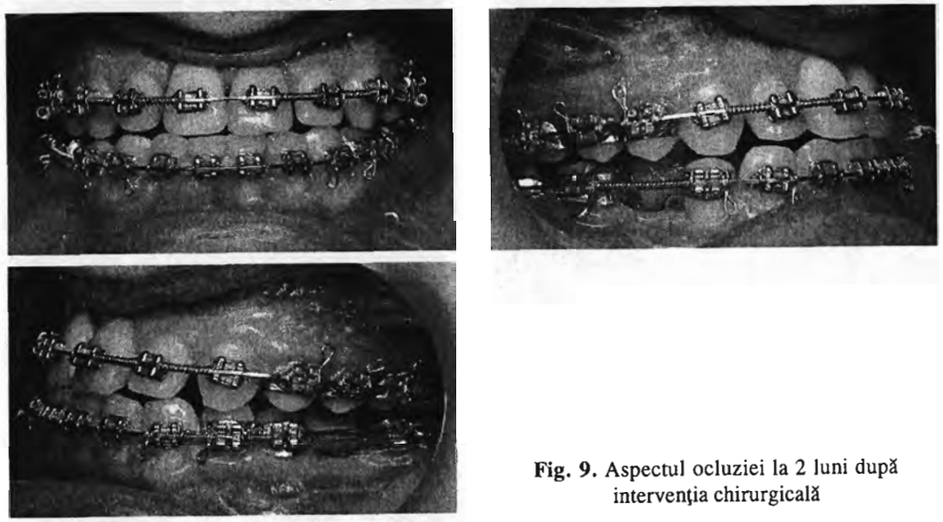


Fig. 9. Aspectul ocluziei la 2 luni după intervenţia chirurgicală

Obiectivele tratamentului au fost:

1. rezolvarea protruziei şi a înghesuirii în arcada maxilară
2. ameliorarea profilului prin avansarea mandibulei.

Planul de tratament a constat în următoarele etape:

1. expansiune palatină rapidă asistată chirurgical pentru corectarea deficitului maxilar transversal
2. tratament ortodontic prechirugical (straight-wire bracketuri Roth 022, Ormco Corp.) având ca obiectiv alinierea şi coordonarea arcadelor
3. osteotomie sagitală bilaterală pentru avansarea mandibulei
4. tratament ortodontic postchirurgical de finisare a ocluziei
5. contenţia rezultatelor (3,4).

Fig. 10. Ocluzia la finalul tratamentului ortodontic

Fig. 11. Teleradiografia la sfârşitul tratamentului ortodontic

Etapa de tratament ortodontic a fost încheiată după 12 luni (fig. 5,6,7).

Tratamentul chirurgical a constat în osteotomie mandibulară bisagitală (fig. 8).

Etapa de tratament ortodontic postchirurgical a durat 6 luni (fig. 9,10).

Faza de contenţie a fost continuată cu retainere Hawley, cu durată de purtare zilnică de 24 h în primele 3 luni, după care s-a trecut la retenţia fixă cu fir torsadat colat de la canin la canin în ambele arcade (5,6).

La un control efectuat la 1 an de la terminarea tratamentului pacientul prezintă la examenul clinic simetrie facială şi un profil armonios cu buza superioară, inferioară, respectiv menton corect poziţionate în campul de profil.

Examenul ocluzal confirmă prezenţa unor relaţii de clasa I, stabile, pacientul necesitând un tratament protetic pentru refacerea continuităţii arcadei inferioare, valorile teleradiografice fiind normalizate (fig. 11).

CONCLUZII

Cazul prezentat pledează pentru efectul favorabil al expansiunii palatine asistate chirurgical şi al avansării chirurgicale a mandibulei în obţinerea unor relaţii ocluzale şi faciale armonioase

BIBLIOGRAFIE

1. Arnett GW, Bergmann RT. Facial keys to orthodontic diagnosis and treatment planning - part II. *AJODO* 1999; 103: 393-411.
2. Arnett GW, Jelic JS, Kim J et al. Soft tissue cephalometric anlysis: diagnosis and treatment planning of dentofacial deformity. *AJODO* 1999; 116: 239-253.
3. Snow MD. Surgical mandibular advancement in adolescents: postsurgical growth related to stability. *Int J Adult Orthod Orthogn Surg* 1991; 6: 143-154.
4. Connole PW, Small EW. Combined maxillary and mandibular osteotomies: discussion of three cases. *J Oral Surg* 1971; 29: 572-578.
5. Betts NJ, Ziccardi VB. Surgically assisted maxillary expansion. In: Fonseca R editor: *Oral and Maxillofacial Surgery*. Philadelphia: WB Saunders, 2000.
6. Sarver DM. *Esthetic Orthodontic and Orthognathic Surgery*. St. Louis: Mosby, 1998.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SOME NEW BISHYDRAZONES DERIVED FROM ISATIN

Gabriela Tătăringă [1], Olivia Dorneanu [2], Eugenia Ştefănescu [1], Maria Dorneanu [1]
"Gr.T.Popa" University of Medicine and Pharmacy Iaşi
1 School of Pharmacy
2 School of Medicine

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SOME NEW BISHYDRAZONES DERIVED FROM ISATIN (Abstract): The scientific literature states that isatin and its derivatives exhibit antibacterial, antifungal, anticonvulsant, cytotoxic and anti-HIV activities. The aim of our study was to enlarge the number of isatin derivatives. **Material and method**: We synthesized some new hydrazones and then, the corresponding bishydrazones using salicylaldehyde. By condensing isatin and its derivatives (methyl-, nitro-, brom-) with hydrazine, corresponding hydrazones were obtained. The bishydrazones were synthesized by refluxing the obtained hydrazones with salicylaldehyde in methanolic solution. The structure of new compounds was confirmed by elemental and spectral analysis. The lipophilicity of the synthesized derivatives was expressed by clog P values. The antibacterial and antifungal activities of the compounds were determined using disk-diffusion method against Gram positive, Gram negative bacteria, and *Candida albicans*. **Results**: New bishydrazines derived from isatin have been synthesized; their structures have been confirmed by elemental and spectral analysis. **Key words**: ISATIN, BISHYDRAZONES, SYNTHESIS, ANTIMICROBIAL

The development of drug resistance at chemotherapeutic agents is a major problem; thus, one of the strategies in the field of synthetic chemistry is the obtaining of new compounds with antimicrobial activity.

The isatin (indolin-2,3-diona) derivatives are reported to show many biological activities (1,2) like antibacterial, antifungal, antiviral, anticonvulsant, cytotoxic, anti-HIV etc.

In continuation of our work on biologically active isatin derivatives, we report the synthesis of new bis-hydrazones derived from isatin and evaluation of their antimicrobial activity.

MATERIAL AND METHOD

The new compounds were prepared in three steps (3,4):

Step 1.

Starting materials was synthetized using general procedures from literature:

- the isatin (1) and 5-methyl-isatin (2) were synthetized by Beckmann transposition of izonitrosoacetanilides;
- 5,7-dibromoisatin (3) and 5-methyl, 7-bromoisatin (4): isatin and 5-methyl isatin were warmed in ethanol 96% and bromine was added dropwise under stirring. After cooling, the resultant solid was filtered, recrystallized, obtaining the compounds (3) and (4);
- 5-nitro-isatin (5): a solution of isatin in H_2SO_4 was added dropwise to a KNO_3 solution in H_2SO_4, maintaining the temperature between 0-4^{0}C.

Step 2. Preparation of monohydrazones (6a-e)

The compounds 6a-e were obtained by modifying the ketonic function from third position of 1-5 compounds, by refluxing

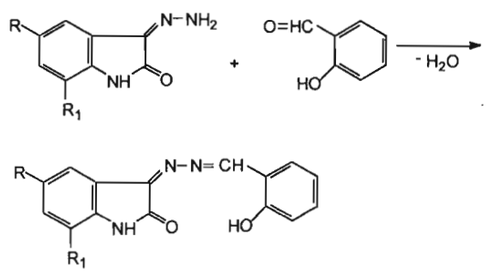


Fig. 1. General procedure for obtaining 7a-e compounds

equimolar quantities of 1-6 and hydrazine hydrate in methanol.

Step 3. Preparation of bis-hydrazones (7a-e) (fig. 1)

A solution of salicylaldehyde in methanol was added to a methanolic solution of isatin monohydrazone (6a-e). The reaction mixture was boiled for 4 hours and after cooling, the solid products were filtred and recrystallised.

The new products have been characterized physico-chemically: melting point, IR spectra, elemental analysis.

The melting points have been determined with a Mel-Temp apparatus and are uncorrected. Spectral analyses have been realized with a Jasco Spectrophotometer FT/IR-670-Plus.

The antimicrobial activity of synthetized compounds has been evaluated using diffusimetric method against Gram positive, Gram negative bacteria and *Candida albicans*.

The tests were performed on Mueller-Hinton agar plates, inoculated with standardized suspension of microorganisms (0.5 mcFarland standard). 20 mL of each compound dissolved in DMSO (20 mg/mL) were put on plates within sterile cylinders.

RESULTS AND DISCUSSIONS

In table I the physico-chemical characteristics of synthetized compounds are presented.

The infrared spectrum of the bishydrazones (7a-e) exhibited a broad band ranging from 3000 to 3300 cm^{-1} and centred around 3065 cm^{-1}, which can be assigned to the hydrogen-bonded OH group (fig. 2).

An intense band for C=O group appear at 1730 cm^{-1}; at 3200 cm^{-1} another band appears which can be attributed to the -NH- vibrations of the indole ring. Vibra-

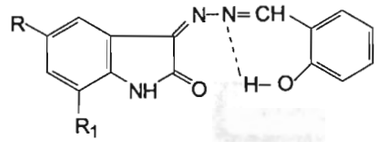


Fig. 2. Structure of the compounds 7a-e

TABLE I

Physico-chemical characteristics of synthetized compounds

Compound	R	R1	Molecular weight	Melting point (^{0}C)	Elemental analysis(c/f)		
					%C	%H	%N
7a	H	H	265.09	216	67.92 66.5	4.18 4.13	15.84 15.31
7b	CH_3	H	279.1	178	68.8 67.97	4.69 4.61	15.05 15.01
7c	Br	Br	423	>430	42.55 42.21	2.12 2.11	9.92 9.89
7d	CH_3	Br	326	264	58.8 58.04	3.68 3.64	12.88 12.78
7e	NO_2	H	310.26	>430	58.06 58.00	3.22 3.15	18.06 18.02

c= calculated
f= found

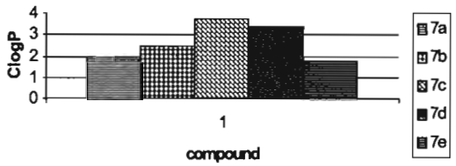


Fig. 3. Calculated values for clog P

tional characteristics of ketimine and aldimine groups are observed at 1640-1620 cm^{-1}.

Lipophilicity of the synthetized derivatives 7a-e is expressed in the term of their clog P values (fig. 3).

From antimicrobial point of view it is ascertained that the investigated compounds are lacked of action both to Gram negative and Gram positive and *Candida albicans*.

CONCLUSIONS

As a conclusion, this paper presents the synthesis of new bishydrazones derived from isatin, whose structure has been confirmed by the results of elemental and spectral analysis; the realized tests indicated the lack of antimicrobial action, in our future research we are going to investigate other biological actions possible for these compounds.

REFERENCES

1. Sridhar KS, Ramesh A. Synthesis and pharmacological activities of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. *Biol Pharm Bull* 2001; 24 (10): 1149-1152.
2. Aboul-Fadd T, Abdel-Hamid F, Abdel-Saboor H. Synthesis, antituberculous activity and pharmacokinetic studies of some Schiff bases derived from 1-alkylisatin and isonicotinic acid hydrazide (INH). *Arch Pharm Res* 2003; 26 (10): 778-784.
2. Murukan B, Mohanan K. Synthesis, characterization, electrochemical properties and antibacterial activity of some transition metal complexes with [(2-hydroxy-1-naphthaldehyde)-3-isatin]-bishydrazone. *Transition Metal Chemistry* 2006; 31: 441-446.
3. Vine KL, Locke MJ, Ranson M, Pyne SG, Bremner JB. *In vitro* cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007; 15 (22): 931-938.

NOUTĂŢI

FIERUL ŞI STRESUL OXIDATIV

Este bine cunoscut faptul ca fierul are rol pro-oxidant. Boala renală cronică (chronic kidney disease-CKD) are un status pro-oxidant prin administrarea intravenoasă de fier folosită frecvent pentru corectarea anemiei. Pe de o parte, există o îndoială că fierul ar cauza stresul oxidativ, iar pe de altă parte, este departe de a fi clar dacă stresul oxidativ odată produs, conduce spre un pronostic nefavorabil. Fierul a avut beneficii care pot fi independente de corecţia anemiei. În plus, există o îngrijorare cu privire la utilizare dozelor mari de eritropoetină care ar putea cauza insuficienţă cardiacă şi deces la pacienţii cu CKD. Astfel, ar fi prudent să se utilizeze judicios fierul la pacienţii care primesc eritropoetină. Fierul, administrat oral, ar fi de preferat ca agent de primă linie la pacienţii nedializaţi. La pacienţii cu sepsis, administrarea intravenoasă de fier ar trebui evitată deoarece, în experimentele pe animale, administrarea de fier intravenos a antrenat răspuns inflamator şi a crescut mortalitatea. Sunt necesare trialuri clinice pentru a stabili beneficiile şi riscurile administrării de fier la pacienţii cu CKD (Agarwal R. Iron, oxidative stress, and clinical outcomes. *Pediatr Nephrol* 2007; 10: 287-291).

Mihaela Munteanu

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

CERCETĂRI ÎN SERIA DERIVAŢILOR DE SEMISINTEZĂ AI RUTOZIDULUI. SINTEZA ŞI CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ ŞI MICROBIOLOGICĂ A UNOR NOI COMPUŞI AI RUTOZIDULUI CU IZONIAZIDA

D. Lupaşcu[1], Cristina Tuchiluş[2], Lenuţa Profire[1]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Farmacie
1 Disciplina de Chimie farmaceutică
2 Disciplina de Microbiologie

RESEARCH CONCERNING RUTIN SEMISYNTHETIC DERIVATIVES. SYNTHESIS, PHYSICO-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISATION OF SOME NEW RUTIN-ISONIAZID DERIVATIVES (Abstract): Isoniazid is one of the most used antituberculosis drugs, but its toxicity is high. In this study, four derivatives of rutin and isoniazid were prepared and their antibacterial and antimycotic activities were investigated. **Method**: Synthesis of these compounds started through reaction of rutin with fresh prepared sodium methoxide, subsequently treating with 1, 3-dichloro-2-propanole, 1-brom-3-chloropropane, 1, 2-dibrom-ethane or dibrommethane and finally, stirring with isoniazid, to afford crystalline, yellow, water soluble powders. **Results**: The four compounds were marginally active against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* and were inactive against *Escherichia coli*. **Conclusion**: We synthesised four new derivatives of rutin and isoniazid; melting points, solubility, yields characterised these compounds, and their structure was confirmed by C, H, N elemental analysis and UV spectra. The compounds showed a modest antibacterial activity. We think that the toxicity of the new derivatives will be lower that of isoniazid toxicity. The next steps in our research will be the toxicological study and antituberculosis assay. **Key words**: FLAVONOIDS, RUTIN, ISONIAZID, TUBERCULOSIS

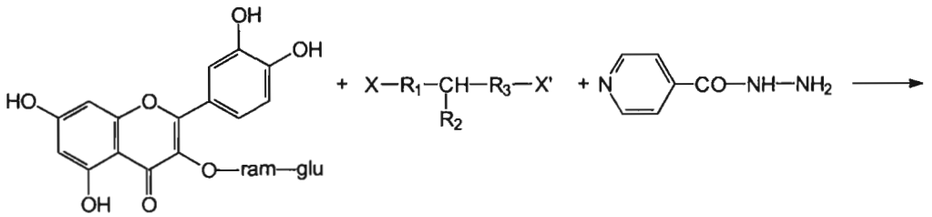
Izoniazida, descoperită în 1952, reprezintă unul din cei mai activi compuşi antituberculoşi; din păcate toxicitatea ei este mare, manifestându-se cu precădere la nivel hepatic (1,2).

Pe de altă parte, rutozidul prezintă o serie de efecte farmacologice importante, dintre care se remarcă acţiunea la nivelul vaselor sanguine şi efectele antioxidante, dar şi proprietăţile antiinflamatoare, confirmate prin numeroase studii; de asemenea, toxicitatea sa, precum şi a unor derivaţi de semisinteză obţinuţi anterior de noi este relativ redusă (3,4,5).

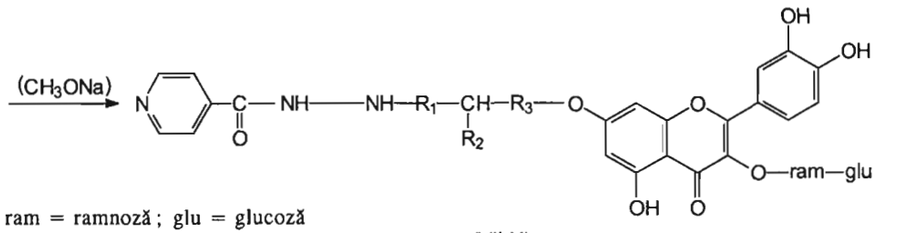
Prin urmare, ne-am propus obţinerea unor derivaţi ai rutozidului cu izoniazida şi unele teste microbiologice preliminare, urmând ca în perpectivă să vedem în ce măsură proprietăţile individuale ale moleculelor componente influenţează toxicitatea şi acţiunea compuşilor finali.

MATERIAL ŞI METODĂ

Derivaţii rutozidului cu izoniazida au fost obţinuţi prin reacţiile rutozidului (I) cu o serie de derivaţi halogenaţi: 1,3-diclor-2-propanol (II), 1-brom-3-clor-propan (III), 1,2-dibrom-etan (IV), dibrom-metan (V) în



(I) (II-V) (VI)



ram = ramnoză; glu = glucoză

(VII-X)

Nr. compus	X	X'	R_1	R_2	R_3
VII	Cl	Cl	CH_2	OH	CH_2
VIII	Br	Cl	CH_2	H	CH_2
IX	Br	Br	CH_2	H	-
X	Br	Br	-	H	-

Fig. 1. Sinteza derivaţilor rutinului cu izoniazida (VII-X)

mediu de metoxid de sodiu, urmate de tratarea cu hidrazida acidului 4-piridincarboxilic (VI) (fig. 1).

-3-[[6-O-(6-deoxi-α-L-manopiranosil)-β-D-glucopiranosil]-oxi]-2-(3,4-dihidroxifenil)-5-hidroxi-7-(oxi-)β-hidroxi-propil)-N-hidrazinocarbonil-4-piridinil)-4H-1-benzopiran-4-ona (VII)

6,64 g (0,01 mol) rutozid (I) se solvă prin agitare magnetică în metoxid de sodiu proaspăt preparat (din 0,25 g sodiu metalic şi 200 ml metanol absolut), continuându-se agitarea timp de o oră, după care se adaugă 1,04 ml (0,011 mol) 1,3-diclor-2-propanol (II) şi se agită încă două ore. Peste acest amestec de reacţie se aduc 1,37 g (0,01 mol) izoniazidă (VI) şi se agită cu agitator magnetic timp de 10 ore. Soluţia obţinută se lasă în repaus 24 ore şi apoi se toarnă în porţiuni mici, sub agitare peste 400 ml izopropanol. Precipitatul format se filtrează şi se usucă la temperatura camerei. Produsul brut se purifică pe coloană (Φ 0,5 cm, 15 cm lungime) cu Silicagel H (dimensiunea particulelor 10-40 mm), debitul soluţiei în alcool 50° fiind de 0,25-0,30 ml/min.

Compusul obţinut (VII) se prezintă sub forma unei pulberi cristaline de culoare galbenă, higroscopică, cu p.t. = 189-191°C.

Este solubil în apă, etanol 50°, dimetilsulfoxid şi dimetilformamidă la rece, solubil în etanol 96° şi metanol la încălzire, parţial solubil în propanol şi dioxan, de asemenea la cald, şi practic insolubil în izopropanol, eter etilic, acetonă, benzen şi cloroform.

Derivaţii VIII-X au fost obţinuţi printr-o tehnică asemănătoare.

Compuşii VII-X au fost caracterizaţi prin formulă moleculară, masă relativă, puncte de topire şi randamente, iar structura lor a fost confirmată prin analiză elementală C, H, N şi analiză spectrală în UV.

Activitatea antimicrobiană am determinat-o prin metoda difuzimetrică. Ca microorganisme test s-au utilizat: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus saprophyticus*, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans*. Testările le-am făcut pe mediu agarizat, tip Mueller-Hinton (Oxoid) şi pe agar Sabouraud.

Din cultura peste noapte, incubată la temperatura optimă (30°C), am preparat o suspensie cu densitatea corespunzătoare tubului 2 din scala turbidimetrică Mac Farland. Suspensia am încorporat-o în proporţie de 1/10 în mediu Mueller-Hinton topit şi răcit la 50°C. Din amestec, după omogenizare, am repartizat în plăci Petri cu diametrul de 9 cm, câte 20 ml. Pe suprafaţa fiecărei plăci, am dispus, după solidificare, rondele de hârtie de filtru impregnate cu substanţele de testat. Rezultatele au fost citite după menţinerea plăcilor la termostat, la 37°C, timp de 24 de ore, pentru bacterii şi la 24 grade Celsius, timp de 48 de ore, pentru *Candida albicans*. Am măsurat cu şublerul şi înregistrat diametrul zonelor de inhibiţie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Au fost obţinuţi patru compuşi originali; aceştia se prezintă sub formă de pulberi cristaline, de culoare galben-închis, cu slab miros caracteristic şi prezintă puncte de topire cuprinse între 189 şi 205°C. Toţi cei patru derivaţi sunt uşor solubili în apă şi alcool de 50°. Unele caracteristici fizico-chimice ale derivaţilor obţinuţi sunt prezentate în tabelul I.

Analiza elementală C, H, N, precum şi analiza spectrală în UV confirmă structurile chimice ale compuşilor (VII-X).

Derivaţii sintetizaţi şi testaţi de noi au activitate antimicrobiană modestă asupra *S. aureus*, *S. saprophyticus* şi *Sarcina lutea*. Se constată că dintre cei patru compuşi,

TABELUL I

Caracterizarea fizico-chimică a derivaţilor VII-X

Nr. comp	Formula moleculară	Masa relativă	Punct de topire (°C)	Randament (%)	Analiza elementală C, H, N % Calculat/Experimental	Analiza spectrală în U.V. ($\lambda_{max.}$, nm)
VII	$C_{36}H_{41}O_{18}N_3$	803,73	189-191	89,2	53,79; 5,14; 5,22 53,84; 5,08; 5,18	262, 365
VIII	$C_{36}H_{41}O_{17}N_3$	787,73	193-196	90,5	54,89; 5,24; 5,33 54,92; 5,22; 5,37	267, 370
IX	$C_{35}H_{39}O_{17}N_3$	773,70	203-205	92,3	54,33; 5,08; 5,43 54,40; 4,99; 5,47	261, 372
X	$C_{34}H_{37}O_{17}N_3$	759,67	198-199	80,0	53,75; 4,90; 5,53 53,80; 4,86; 5,51	260, 371

TABELUL II

Activitatea antimicrobiană a derivaţilor VII-X

Microorganism test	Diametrul zonei de inhibiţie (în mm) corespunzător compusului:			
	VII	VIII	IX	X
S. aureus	11	11	12	15
S. saprophyticus	15	13	0	10
Bacillus cereus	7	7	10	8
Bacillus subtilis	0	0	0	10
Sarcina lutea	12	12	16	12
Escherichia coli	0	0	0	0
Candida albicans	0	0	0	0

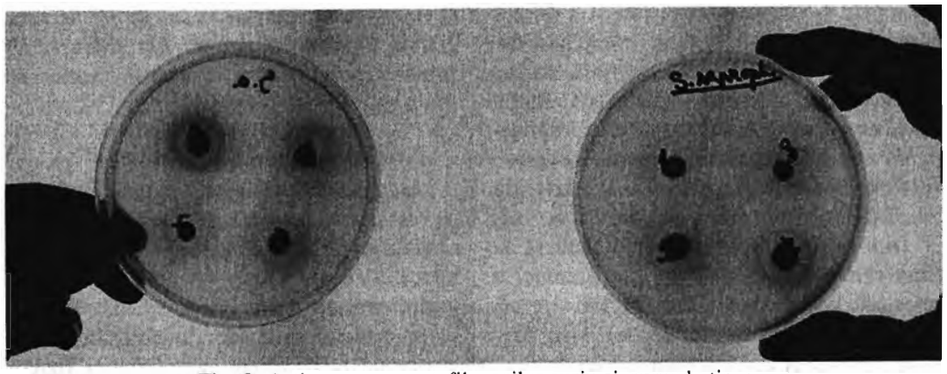


Fig. 2. Acţiunea asupra stafilococilor auriu si saprophyticus

derivatul X are cea mai bună activitate antimicrobiană (fig. 2, tab. II).

CONCLUZII

Au fost obţinuţi patru noi derivaţi ai rutinului cu izoniazida, nesemnalaţi în literatura de specialitate.

Compuşii au fost caracterizaţi prin puncte de topire, formule moleculare, mase relative şi solubilitate în diverşi solvenţi organici.

Structura noilor compuşi a fost confirmată prin analiză elementală C, H, N şi analiză spectrală în UV.

Am testat activitatea antimicrobiană a compuşilor obţinuţi; aceştia s-au dovedit a avea acţiune asupra *S. aureus* şi *S. saprophyticus* şi asupra *Sarcina lutea*.

Noii compuşi înglobează în structură două molecule biologic active: un rest de izoniazidă, cu acţiune antituberculoasă, dar toxicitate mare şi molecula de rutozid, care, pe lângă efectele farmacologice cunoscute, prezintă o toxicitate relativ scăzută; prin urmare, considerăm îndreptăţite studiile farmaco-toxicologice, pentru a urmări în ce măsură proprietăţile individuale ale moleculelor componente influenţează toxicitatea şi acţiunea compuşilor finali.

BIBLIOGRAFIE

1. Harries AD, Dye C. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100 (5-6): 415-431.
2. Idilman R, Ersoz S, Coban S, Kumbasar O, Bozkaya H. Antituberculous therapy-induced fulminant hepatic failure: Successful treatment with liver transplantation and nonstandard antituberculous therapy. *Liver Transpl* 2006; 12 (9): 1427-1430.
3. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation* 1997; 21: 347-356.
4. Selloum L, Bouriche H, Tigrine C, Boudoukha C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Exp Toxic Pathol* 2003; 54: 313-318.
5. Selloum L, Reichl S, Muller M et al. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 2001: 395: 49-56.

SERUM ZINC AND COPPER LEVELS IN SOME DERMATOLOGICAL DISEASES

Claudia Butnaru[1], Mihaela Pascu[2], Cornelia Mircea[1], Luminiţa Agoroaei[1], Laura Solovăstru[3], D. Vâţă[3], Elena Butnaru[1], Zenaida Petrescu[3]

"Gr.T. Popa" University of Medicine and Pharmacy Iaşi
School of Pharmacy
1 Department of Toxicology
2 Department of Physics
School of Medicine
3 Dermatology Clinic

SERUM ZINC AND COPPER LEVELS IN SOME DERMATOLOGICAL DISEASES (Abstract): Zinc (Zn) and copper (Cu) are essential metals for biochemical processes in the body. Many researchers have main interest in these two metals because it was establish that they are involved in immunological and inflammatory reactions. **Material and methods**: The study comprised 49 patients of Dermatology Clinic from Iaşi with different skin diseases (21 with psoriasis and 28 with varicose ulcer), during January - May 2006. The patients, both sexes, had ages between 19 and 81 years old. We determinated serum Zn and Cu levels by atomic absorption spectrophotometry. The results were expressed in mg/L and we calculated Cu/Zn ratio, too; the values were compared with 50 healthy controls. **Results**: In psoriasis, serum Zn and Cu mean levels (5.61 mg/L, respectively 1.27 mg/L) were higher as compared to controls (significance level p=0.04); the mean Cu/Zn ratio was 0.81 in psoriasis and 0.96 in control group. In varicose ulcer, mean levels were significantly increased (Zn-7.62 mg/L, Cu-1.38 mg/L) compared to control group (Zn-0.81 mg/L, Cu-0.75 mg/L) and serum normal values; the mean Cu/Zn ratio was 1.00. 18 of all patients with psoriasis and varicose ulcer had higher serum Zn and Cu levels than normal values. **Key words**: ZINC, COPPER, PSORIASIS, VARICOSE ULCER, SKIN DISEASES

Zinc (Zn) and copper (Cu) are two essential metals with important roles for biochemical processes in the body. Many researchers have main interest in these two metals because the reveals establish that they are involved in immunological and inflammatory reactions. Zn is involved in growing processes and many enzyme reactions. The low concentrations of Zn lead to depression of immune system and atrophy of thymus and of other lymphoid tissues. Zn interferes in inflammatory processes because it acts in granulocytes and macrophages migration, also in chemotactic activity of monocytes and neutrophils (1,2).

Cu is a metal involved in prostagladins biosynthesis and it is the element responsible for initial phases of inflammatory process. Low Cu diet leads to the decrease of collagen biosynthesis with changes in conjunctive tissue metabolism. Cu and Zn implications impose clinical determination of these elements in varied compartments of body, especially in serum (2,3,4).

We determinated the concentrations of Zn and Cu in patients with different dermatitis and we chose psoriasis and varicose ulcer from all diseases because the number

of samples allowed us to do the statistics.

Psoriasis is a benign autoimmune chronic skin disease and erythematic and squamous lesions characterize it; they occur frequently on the skin of elbows, knees and scalp. Psoriasis is difficult to treat and it may appear arthritis and erythrodermic psoriasis. The varicose ulcer or shank ulcer is a skin ulcer placed on distal part of shank and it appears on a varices background (5,6,7).

MATERIAL AND METHOD

The serum concentrations of Zn and Cu were determinated by atomic absorption spectrophotometry for the patients of Dermatology Clinic from Iaşi, Romania. The study was done during January – May 2006 period and it comprised 49 patients of both sexes: 21 with psoriasis and 28 with varicose ulcer. The age of patients with psoriasis varied between 19 and 79 years old and for those with varicose ulcer between 26 and 81 years old. The results were expressed in mg/L and we calculated Cu/Zn ratio, too. The obtained values were compared with serum normal levels and with values of 50 healthy controls.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The serum concentrations of Zn and Cu in studied skin diseases are presented in table I.

For psoriasis, serum levels of Cu varied between 0.23 and 2.08 mg/L, mean 1.27, in 21 patients (9 women and 12 men), aged from 19 to 79 years (mean 51.14). The variation of serum Cu values in comparison to controls, in psoriasis, by age groups, is presented in figure 1.

The statistics showed that the mean Cu value was significantly (significance level $p=0.04$) increased in comparison to the control values. From all patients, 10 of them

TABLE I

The serum minimum (Min.), maximum (Max.) and mean values of Zn and Cu, in psoriasis, varicose ulcer and controls

Disease	Number of patients	Cu (mg/L)			Zn (mg/L)			Cu/Zn ratio		
		Max.	Min.	Mean	Max.	Min.	Mean	Max.	Min.	Mean
Psoriasis	21	2.08	0.23	1.27	20.79	0.42	5.61	2.73	0.06	0.81
Varicose ulcer	28	2.30	0.34	1.38	23.42	0.20	7.62	3.96	0.04	1.00
Controls	50	1.62	0.23	0.75	1.36	0.60	0.81	2.34	0.34	0.96

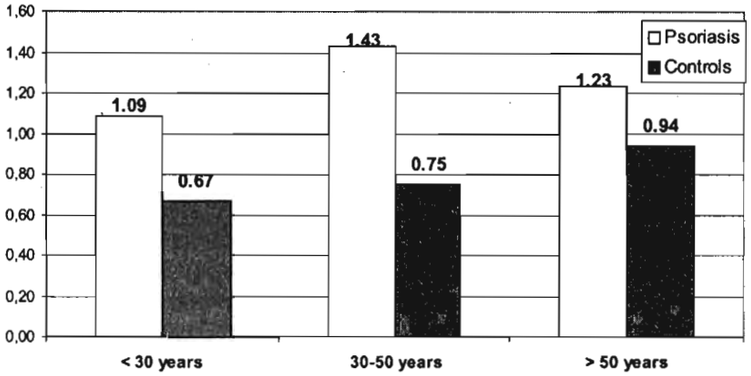


Fig. 1. The variation of mean serum Cu values in comparison to controls, in psoriasis

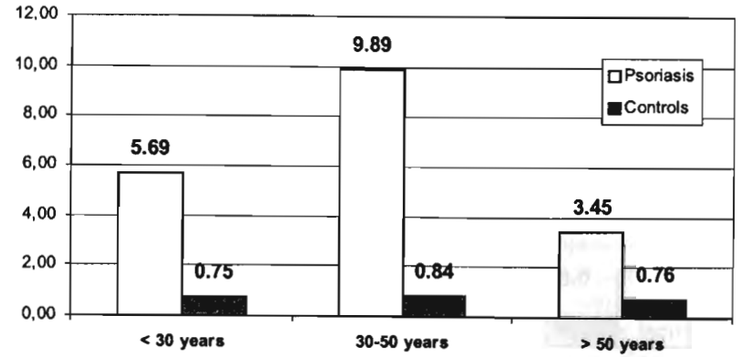


Fig. 2. The variation of mean serum Zn values in comparison to controls, in psoriasis

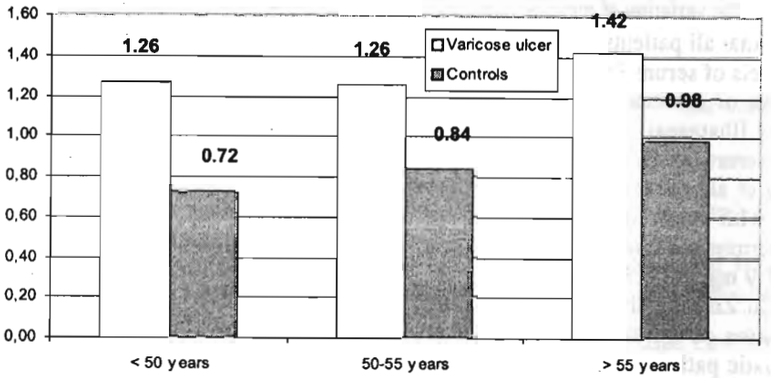


Fig. 3. The variation of mean serum Cu values in comparison to controls, in varicose ulcer

(47.62%) had serum Cu values higher than normal levels (0.95-1.35 mg/L) and 4 patients (19.04%) had lower values; only 7 values (33.34%) had normal levels.

The references provide contradictory data regarding serum Cu concentration in psoriasis: it increases (8,9,10) or it decreases (11).

The serum Zn concentrations varied between 0.42 and 20.79 mg/L; mean 5.61. Figure 2 notices the variation of serum Zn concentrations in comparison to controls, in psoriasis, by age groups.

The serum Zn concentrations were significantly increased than the control values. Only one patient had serum Zn value in normal limits (0.74-1.30 mg/L), many patients had higher values (13 samples).

Data from research literature regarding serum Zn concentration in psoriasis are more numerous. Bruscke and Salfeld (1987)

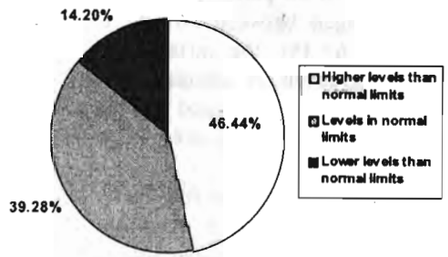


Fig. 4. The serum Cu concentrations in comparison to normal limits (0.95 - 1.35 mg/L), in patients with varicose ulcer

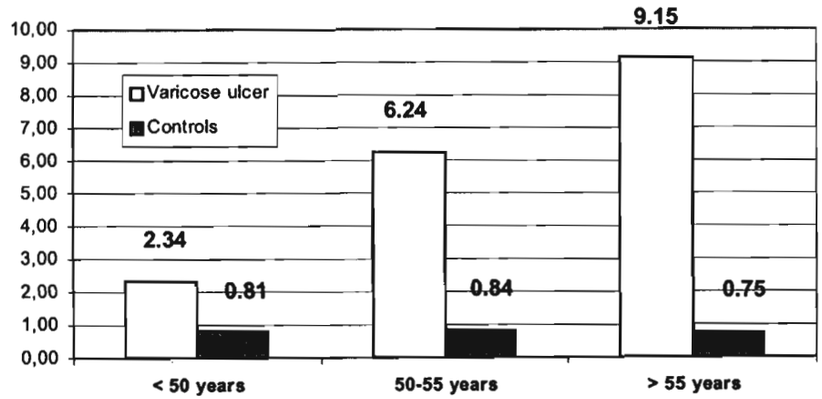


Fig. 5. The variation of mean serum Zn values in comparison with control in varicose ulcer

remarked that all patients with psoriasis had higher levels of serum Zn (12). The patients with active or remitted psoriasis who were studied by Bhatnagar et al. (1994) had high levels of serum Zn (11).

Arora et al. (2002) studied 75 psoriatic patients with different skin diseases and they determinated mean serum Zn value 93.3±25.9 mg/mL (13).

The Cu/Zn ratio showed more evidently the evolution of the disease in time (9,10). For psoriatic patients from Iasi Cu/Zn ratio was between 0.06 and 2.78; mean 0.81. Because we did not study the cases during evolution, we may not make a correlation with known data. In comparison to controls, Cu/Zn ratio was lower in psoriatic patients.

In *varicose ulcer,* serum Cu concentrations were between 0.34 and 2.30 mg/L, mean 1.38. In 28 patients (14 women and 14 men), aged between 26 and 81 years (mean age 62.35), the variation of serum Cu concentrations in comparison to controls, by age groups showed that they were the highest in the group over 55 years old (fig. 3).

In comparison to controls there was an increase of mean values of serum Cu in varicose ulcer and in comparison to normal limits obtained values are summing up in figure 4.

We do not dispose of data regarding the serum Cu levels in varicose ulcer. In patients with varicose ulcer there were recorded values between 0.20 and 23.42 mg/L Zn in serum, the mean value was 7.42; figure 5 represents the variation of serum Zn concentrations in comparison to controls, by age groups.

The patients with varicose ulcer had significantly higher serum Zn values than controls. Figure 6 presents the variation of obtained values in comparison to normal levels.

Rojas and Phillips (1999) determinated significantly lower serum Zn values ($p < 0.0001$ in men and $p=0.027$ in women) in patients with chronic varicose and they made the observation that diet deficiency of Zn

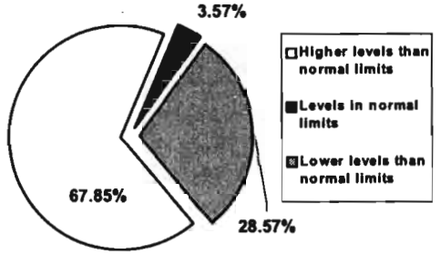


Fig. 6. The serum Zn concentrations in comparison to normal limits (0.74 - 1.30 mg/L) in patients with varicose ulcer

affected rate of cure (14).

In our study Cu/Zn ratio in patients with varicose ulcer varied between 0.04 and 3.96, mean 1.00. In comparison to the mean of Cu/Zn ratio for control group (0.96), in patients with varicose ulcer the ratio was slightly higher.

From all obtained data, in the group of patients with psoriasis and varicose ulcer 18 samples (36.73%) had higher values than normal limits both in Cu and Zn. Both elements had normal limits in control group.

The mean Cu/Zn ratio was higher in patients with varicose ulcer (1.00) than in psoriatic patients (0.81), in comparison to control group.

CONCLUSIONS

We determined serum Cu and Zn levels in patients with psoriasis and varicose ulcer. For psoriasis, serum Cu levels were increased in comparison to controls; in the same way, serum Zn levels were increased and many samples had higher values than limits. For varicose ulcer, serum Cu and Zn concentrations were higher than controls. The Cu/Zn ratio was increased in both psoriasis and varicose ulcer.

REFERENCES

1. Molokhia MM. Zinc and copper in dermatology. In: Charles CT editor. *Zinc and Copper in Medicine*. Springfield, 1980.
2. Petrescu Z, Dobescu Al, Cotrău M et al. Zincul şi cuprul seric în lichenul plan, peladă şi colagenoze. *Dermato-venerologie* 1985; XXX: 241-245.
3. Smith JC, Holbrook JT, Danford DE. Analysis and evaluation of zinc and copper in human plasma and serum. *J Am Coll Nutrition* 1985; 4: 627-638.
4. El-Kholy MS, Gas Allah MA, el-Shimi S, el-Baz F, el-Tayeb H, Abdel-Hamid MS. Zinc and copper status in children with bronchial asthma and atopic dermatitis. *J Egypt Public Health Assoc* 1990; 65 (5-6): 657-668.
5. Hinks LJ, Young S, Clayton B. Trace element status in eczema and psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 1987; 12: 93-97.
6. McMillan EM. Plasma zinc in psoriasis: relation to surface area involvement. *Br J Dermatol* 1983; 108: 301.
7. Shameer P, Prasad PV, Kaviarasan PK. Serum zinc level in vitiligo: a case control study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005; 71: 206-207.
8. Donadini A, Pazzaglia A, Desirello G, Minoia C, Colli M. Plasma levels of Zn, Cu and Ni in healthy controls and in psoriatic patients. Possible correlation with vitamins. *Acta Vitaminol Enzymol* 1980; 2 (1-2): 9-16.
9. Tasaki M, Hanada K. Hashimoto I. Analysis of serum copper and zinc levels and copper/zinc ratios in skin diseases. *J Dermatol* 1993; 20 (1): 21-24.
10. Nigam PK. Serum zinc and copper levels and Cu:Zn ratio in psoriasis, *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005; 71: 205-206.
11. Bhatnagar M, Bapna A, Khare AK. Serum proteins, trace metals and phosphatases in psoriasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 1994; 60 (1): 18-21.
12. Bruscke K, Salfeld K. Zinc and its status in some dermatological diseases - a statistical assessment. *Z Hautkl* 1987; 62 (supl 1): 125-131.
13. Arora PN, Dhillon PS, Rajan SR, Sayal SK, Das Al. Serum zinc levels in cutaneous disorders. *Med J Armed Forces India* 2002; 58 (4): 304-306.
14. Rojas AI, Phillips TJ. Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes, and zinc. *Dermatol Surg* 1999; 25 (8): 601-604.

PRODUCŢIA DE SPECII REACTIVE ALE OXIGENULUI INDUSĂ DE CHEMOATRACTANŢI ÎN NEUTROFILE UMANE. ROLUL ISOFORMELOR PROTEIN-KINAZEI C

O. Bredeţean[1], Al.D. Ciochină[2], O.C. Mungiu[3]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T.Popa" Iaşi
Facultatea de Bioinginerie Medicală
1 Disciplina de Biotehnologii avansate
2 Disciplina de Fiziologie normală şi patologică
Facultatea de Medicină
3 Disciplina de Farmacologie

CHEMOATTRACTANT-INDUCED REACTIVE OXIGEN SPECIES PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILS - ROLE OF PROTEIN KINASE C ISOFORMS (Abstract): The aim of our study was to characterize the priming effect of extracellular nucleotides on reactive oxygen species (ROS) production induced by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), interleukin-8 (IL-8), leukotriene B4 (LTB4), and platelet activating factor (PAF). Also, we investigated the roles played by different protein kinase C (PKC) isoforms in nucleotide-induced priming. ROS production was determined by an isoluminol-based assay. **Material and method**: Nucleotide-induced priming was concentration- and time-dependent. The concentration of UTP able to cause maximal priming was 10 μM. When UTP (10 μM) was administered prior the agonist, the increase of the amplitude of the response reached the maximum at 1 minute of pre-incubation with the nucleotide. **Results**: Calcium depletion of neutrophil caused significant inhibition of ROS production induced by all agonists tested, but did not affect the priming effect of the nucleotides. We tested the effect of several PKC inhibitors on the nucleotide-induced priming. GF 109203X (5 μM), an inhibitor of all neutrophil's PKC isoforms, or RO 31-8220 (5uM), an inhibitor of classical and novel PKC isoforms, abolished the responses induced by fMLP (10 nM) IL-8 (10 nM), LTB4 (100 nM) or PAF (100 nM). Go 6976 (100 nM), a selective inhibitor of classical PKC isoforms, had no effect on nucleotide-induced priming, suggesting that activation of these PKC isoforms does not play a role in the priming effect. Rottlerin (5 μM), a PKC delta inhibitor, almost abolished the effect of fMLP in the absence or in the presence of UTP, indicating that PKC delta is essential for the fMLP-induced effect; rottlerin also caused inhibition of ROS production induced by IL-8, LTB4 or PAF, however the priming effect of UTP was not affected for these chemoattractants. Our data suggest that classical PKC isoforms do not play a role in chemoattractant-induced ROS production. **Conclusion**: Although fMLP induced effect appears to be highly dependent on PKC delta activation, other chemoattractants are able to cause ROS production through PKC delta-independent mechanisms. **Key words**: NEUTROPHIL, ROS, PKC ISOFORM, PKC INHIBITOR

Nucleotidele extracelulare pot induce o varietate mare de răspunsuri în diferite tipuri de celule, răspunsuri ce includ contracţia şi relaxarea musculară, vasodilataţie, neurotransmisie, agregarea plachetară, reglarea transportului ionic, creşterea celulară ş.a. În vase, plachetele şi celulele endoteliale eliberează nucleotide când sunt expuse la stimuli cum ar fi ischemia, hipoxia şi stres-ul chimic sau mecanic (1). Receptorii care mediază aceste efecte sunt denumiţi receptori P2, activaţi de o varietate de nucleotide inclusiv ATP şi UTP, şi receptori P1, care sunt activaţi de adenozină. Există două tipuri de receptori P2 pentru purine: tipul P2Y cuplaţi cu proteina G (G protein-coupled receptors, GPCRs), şi tipul P2X cuplaţi cu canale ionice (ligand-gated ion channels). S-a arătat că celulele vasculare exprimă ambele tipuri de receptori (P2Y şi P2X)(2).

Receptorii P2Y au şapte domenii transmembranare hidrofobe cu o terminaţie amino extracelulară scurtă şi o terminaţie carboxil intracelulară responsabilă de activarea căii fosfoinozitidelor (3,4,5). Receptorii P2Y sunt subdivizaţi în subtipurile cuplate cu proteina Gq ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{15}$) şi subtipurile cuplate cu proteina Gi ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$). În plus, receptorul $P2Y_{11}$ se cuplează la proteina Gs şi activează adenilil ciclaza.

Studiile mai vechi subliniază că răspunsurile biologice activate în neutrofile de către ATP şi UTP sunt mediate de un receptor $P2Y_2$-like, descris iniţial ca receptor P2U (6). Recent am demonstrat că în neutrofilele umane mobilizarea Ca^{2+} indusă de nucleotide, eliberarea granulelor primare şi activarea kinazei Erk 1/2 reglată de semnale extracelulare sunt mediate de receptorul $P2Y_2$ (7).

Este bine stabilit că nucleotidele extracelulare sunt capabile să determine evenimente de semnalizare intracelulară în polimorfonuclearele (PMN) umane cum ar fi fosforilarea protein-kinazei activate de mitogeni („miotgen-activated protein kinase" - MAPK). Mai mult, s-a aratat ca nucleotidele extracelulare determină şi răspunsuri funcţionale în PMN cum ar fi creşterea expresiei Mac-1, creşterea aderenţei la celulele endoteliale sau „armarea" PMN („priming"), pentru producţia de specii reactive ale oxigenului („reactive oxygen species" - ROS), indusă de chemoatractanţi.

În acest studiu am încercat caracterizarea efectului „priming" al nucleotidelor extracelulare asupra producţiei de ROS indusă de patru agonişti diferiţi - formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), interleukina-8 (IL-8), leucotriena B4 (LTB4) şi factorul de activare plachetară (PAF) - şi am investigat rolul jucat de diferite isoforme de proteinkinaze C (PKC) în „priming"-ul indus de nucleotide.

MATERIAL ŞI METODE

Reactivi: Toate nucleotidele, GF 109203X, RO 31-8220, Go 6976, rottlerin, albumină serică bovină (BSA; fracţia V), fMLP, LTB4, PAF au fost obţinute de la Sigma (St. Louis, MO), IL-8 de la Peprotech (Rocky Hill, NJ). Dextran T500, Ficoll-Paque au fost de la Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Izolarea neutrofilelor: Sângele venos a fost colectat de la subiecţi sănătoşi în tuburi de polipropilenă conţinând ca anticoagulant ACD (1.5% acid citric, 2.5% citrat de sodiu , 2% dextroză). Sângele a fost amestecat cu un volum egal de dextran T500 3% în soluţie salină. Eritrocitele au fost lăsate să sedimenteze timp de 20 minute apoi plasma bogată în leucocite a fost supusă centrifugării pe Ficol-Paque la 400xg timp de 45 minute. Peleta a fost colectată iar eritrocitele contaminante au fost înlăturate prin liză hipotonă. Neutrofilele izolate au fost resuspendate în soluţie salină Hank tamponată (HBSS) conţinând 0.2% albumină serică bovină (BSA). Neutrofilele au fost numărate utilizând un hemocitometru Reichert-Jung (Hausser Scientific, Horsham, PA). Viabilitatea celulelor a fost controlată prin metoda excluziunii cu albastru Tripan şi a fost găsită în mod constant mai mare de 96%.

Măsurarea producţiei de ROS: Eliberarea de ROS a fost măsurată după cum a fost descris în altă publicaţie (8). În câteva cuvinte, peroxidaza (HRP, "horseradish

peroxidase"), 1 U/ml şi isoluminol (5 μM) au fost adăugate la suspensiile de neutrofile (2 x 10^6 celule/ml) într-o cuveta de sticlă, cu amestecare continuă la 37 şC, într-un lumi-agregometru model 560-CA (Chronolog Corp, Havertown, PA). Celulele au fost lăsate câteva minute (2 min.) pentru echilibrare iar reactivii au fost adăugaţi suspensiilor de celule cu înregistrarea continuă a semnalului luminos cu ajutorul unui recorder. Producţia de ROS a fost determinată pe neutrofilele în mediu cu şi fără Ca^{2+}, cu şi fără pre-incubare cu nucleotide, în prezenţa sau absenţa inhibitorilor de protein kinază C (PKC). Au fost comparate mediile vârfurilor semnalelor de luminiscenţă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma experimentelor efectuate am determinat că „priming"-ul indus de nucleotide este dependent de timpul de pre-incubare (date neprezentate) şi concentraţia nucleotidelor în mediu. Concentraţia de ATP şi UTP capabilă să determine un efect „priming" maximal a fost de 10 mM. Concentraţii mai mari de 100 mM determină o scădere importantă a efectului "priming", posibil prin două mecanisme: (i) desensibilizarea receptorilor $P2Y_2$ sau (ii) prin generarea de adenozină, care se cunoaşte că are efecte inhibitoare asupra unor funcţii ale neutrofilelor umane (9,10).

Când nucleotidele au fost administrate în concentraţie de 10 mM, înainte de agonist, creşterea amplitudinii răspunsului a atins maximul după un minut de pre-incubare cu nucleotide (fig. 1, 2).

Graficele din figurile 1 şi 2 prezintă valorile medii ale vârfurilor chemiluminiscenţei din 4-5 experimente independente, exprimate în unităţi relative (imaginile din stânga) sau valori procentuale (imaginile din dreapta; am considerat valoarea de 100% răspunsul determinat de chemoatractanţi fără pre-incubare cu UTP sau ATP, pe grafic această situaţie corespunzând poziţiei „Control").

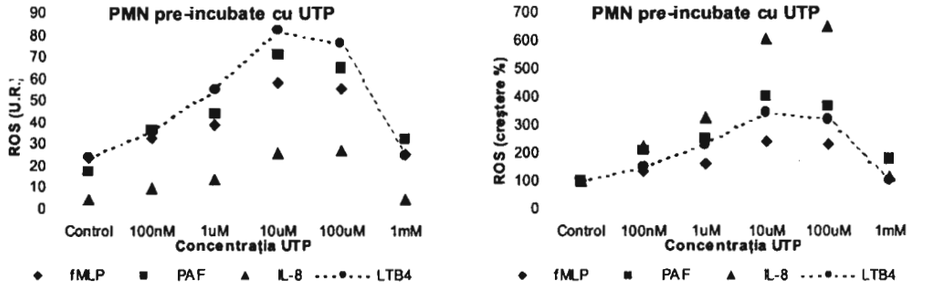


Fig. 1. UTP potenţează producţia de ROS indusă de chemoatractanţi într-o manieră dependentă de doză

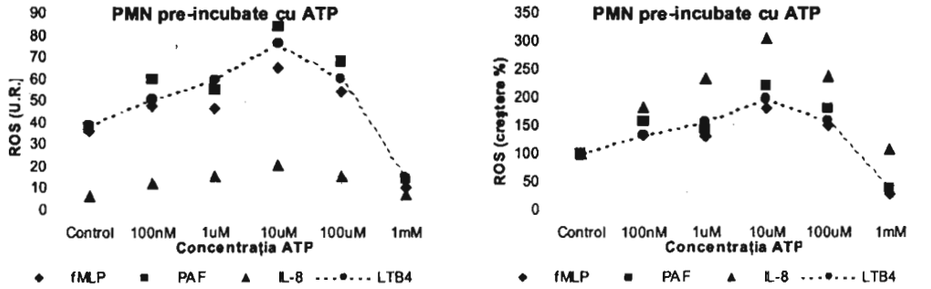


Fig. 2. ATP potenţează producţia de ROS indusă de chemoatractanţi într-o manieră dependentă de doză

S-a arătat anterior că receptorul P2Y2 este cuplat cu activarea fosfolipazei C (PLC), mobilizarea calciului şi activarea PKC (11). Depletizarea de calciu a neutrofilelor determină o inhibiţie semnificativă a producţiei de ROS indusă de toţi agoniştii testaţi dar nu influenţează efectul de potenţare-"armare" exercitat de nucleotide (date neprezentate).

Pentru a preciza rolul isoformelor PKC în efectul de armare indus de nucleotide am testat acţiunile unor inhibitori de PKC.

Go 6976 (100 nM), un inhibitor selectiv al isoformelor clasice ale PKC, nu are efect asupra „priming"-ului indus de nucleotide, sugerând că activarea acestor isoforme nu joacă rol în fenomenul celular studiat de noi (fig. 3.)

GF109203X (5 mM), un inhibitor al tuturor isoformelor de PKC prezente în neutrofile (fig. 4.) sau Ro31-8220 (5 mM), un inhibitor al isoformelor clasice şi "noi" (fig. 5.), abolesc răspunsurile induse de fMLP (10 nM), IL-8 (10 nM), LTB4 (100nM) sau PAF (100nM). Am găsit că UTP-ul şi

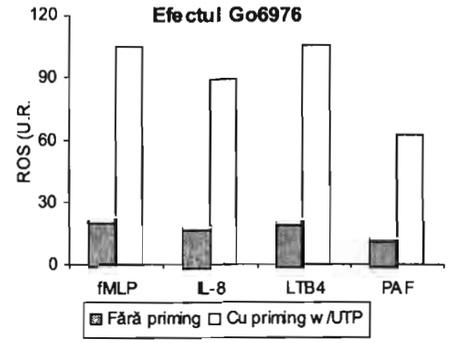


Fig. 3. Efectul inhibitorului PKC, Go6976, asupra producţiei de ROS în neutrofilele umane. Valorile prezentate în grafic reprezintă mediile a cel puţin 4 experimente independente

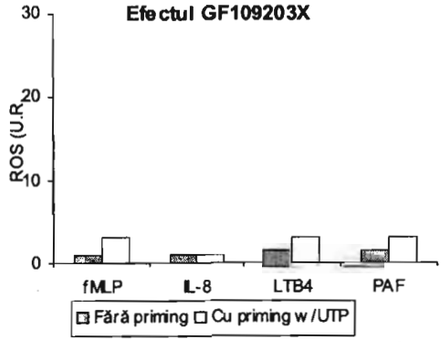


Fig. 4. Efectul inhibitorului PKC, GF109203X, asupra producţiei de ROS în neutrofilele umane. Valorile prezentate în grafic reprezintă mediile a cel puţin 4 experimente independente

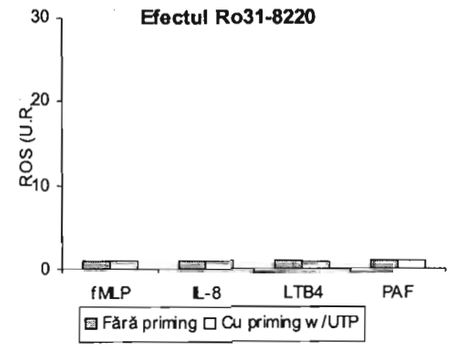


Fig. 5. Efectul inhibitorului PKC, Ro31-8220, asupra producţiei de ROS în neutrofilele umane. Valorile prezentate în grafic reprezintă mediile a cel puţin 4 experimente independente

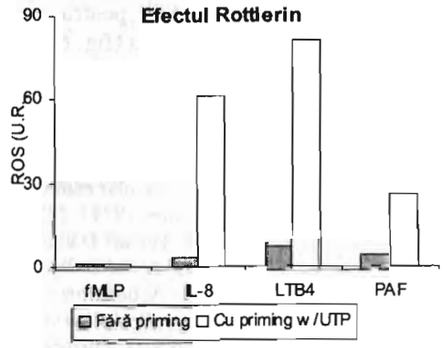


Fig. 6. Efectul inhibitorului PKC delta, Rottlerin, asupra producţiei de ROS în neutrofilele umane. Valorile prezentate în grafic reprezintă mediile a cel puţin 4 experimente independente

toţi chemoatractanţii testaţi sunt capabili să determine fosforilarea isoformelor clasice (PKC alfa şi PKC beta) de PKC (date neprezentate). Imaginea din Fig. 4. ar sugera persistenţa efectului priming ceea ce nu este adevărat; scala axei "y" a fost în mod deliberat aleasă cu maxim de 30 U.R. (unităţi relative), pentru a avea totuşi un termen de comparaţie cu celelalte figuri.

Rottlerin (5mM), un inhibitor al PKC delta, aproape aboleşte efectul fMLP în prezenţa sau absenţa UTP şi ATP, ceea ce sugerează că PKC delta este esenţială pentru efectul indus de fMLP; rottlerin determină de asemenea inhibarea producţiei de ROS induse de IL-8, LTB4 sau PAF dar efectul „priming" al UTP şi ATP pentru aceşti chemoatractanţi nu este afectat (fig. 6.). Am găsit de asemenea că PKC delta este fosforilată (activată), după un minut de la preincubare a PMN cu UTP (date neprezentate).

CONCLUZII

Datele obţinute de noi sugerează că isoformele „clasice" de PKC nu joacă nici un rol în producţia de ROS indusă de chemoatractanţi sau în „priming"-ul mediat de receptorii $P2Y_2$ dar că activarea lor poate fi în relaţie cu alte răspunsuri funcţionale în PMN.

Deşi efectul indus de fMLP pare a fi dependent de activarea PKC delta, alţi chemoatractanţi sunt capabili să determine producţia de ROS prin intermediul unor mecanisme independente de această isoformă a protein kinazei C.

BIBLIOGRAFIE

1. Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 1979; 281: 384-386.
2. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001; 97: 587-600.
3. Ralevic V, Burnstock G. Actions mediated by P2-purinoceptor subtypes in the isolated perfused mesenteric bed of the rat. *Br J Pharmacol* 1988; 95: 637-645.
4. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* 1998; 78: 113-145.
5. Gao Z, Chen T, Weber MJ, Linden J. A2B adenosine and $P2Y_2$ receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. Cross-talk between cyclic AMP and protein kinase C pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 5972-5980.
6. Dubyak GR, Cowen DS, Meuller LM. Activation of inositol phospholipid breakdown in HL60 cells by P2-purinergic receptors for extracellular ATP. Evidence for mediation by both pertussis toxin-sensitive and pertussis toxin-insensitive mechanisms. *J Biol Chem* 1988; 263: 18108-18117.
7. Meshki J, Tuluc F, Bredeţean O, Ding Z, Kunapuli SP. Molecular mechanism of nucleotide-induced primary granule release in human neutrophils: role for the P2Y2 receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C264-271.
8. Granfeldt D, Dahlgren C. An intact cytoskeleton is required for prolonged respiratory burst activity during neutrophil phagocytosis. *Inflammation* 2001; 25: 165-169.
9. Haskó G, Pacher P. A_{2A} receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol* 2007; (Epub ahead of print).
10. Inoue Y, Chen Y, Hirsh MI, Yip L, Junger WG. A3 and $P2Y_2$ receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis. *Shock* 2007; (Epub ahead of print).
11. Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-b2 and -b3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 2000; 287: 1046-1049.

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat., Iaşi - 2008 - vol. 112, nr. 1

SISTEM DE MONITORIZARE A PARAMETRILOR CARDIOVASCULARI PENTRU CONDUCĂTORI AUTO

R. Ciorap[1], D. Zaharia[1], C. Corciovă[1], Monica Ungureanu[2], R. Lupu[3]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Bioinginerie Medicală
1 Disciplina Instrumentaţie Biomedicală
Facultatea de Medicină
2 Disciplina Medicină de familie
Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" Iaşi
3 Facultatea de Automatică şi calculatoare

MONITORING SYSTEM FOR CARDIOVASCULAR PARAMETERS OF DRIVERS (Abstract): In the world the road traffic accidents are in the 3rd place at WHO cause-of-death statistics. One of the main causes of these accidents is driving fatigue as results of stress. The aim of this study is to monitoring the heart rate variability for identifying the grade of stress of the drivers. **Material and method**: For this stage of the study we design and build an device that recording the ECG signal and the heart rate. We analised of line the heart rate variability for determining one possible link between the grade of fatigue and heart rate variability. The device use only two electrodes placed on the steering wheel. **Results**: We use three categories of subjects: beginner drivers, amateur drivers with more than 3 year experience, and expert drivers. The monitoring is made for 30 minutes in intensive traffic. **Conclusion**: The preliminary results are satisfactory which determine us to continuing the research in this direction. **Key words**: ECG MONITORING, HEART RATE VARIABILITY

Accidentele rutiere sunt probleme globale care afectează toate sectoarele societăţii, în anul 2000 înregistrându-se la nivel mondial 1.260.000 de decese în accidente de circulaţie reprezentând 2,2% din totalitatea deceselor, fiind cauza principală a deceselor pentru persoanele cu vârsta între 15 şi 44 ani. Prognoza OMS pentru anul 2020 indică trecerea accidentelor de circulaţie pe locul 3 la cauza deceselor după sinucideri şi afecţiuni cardiovasculare. Un mare număr de accidente a avut ca principală cauză oboseala la volan, apărută mai ales pe fondul unui stres ocupaţional major.

Stresul ocupaţional nu mai poate fi considerat ocazional şi o problemă personală care poate fi remediat prin soluţii paleative. El devine un fenomen global care afectează toate categoriile de angajaţi, toate locurile de muncă din toate ţările dezvoltate. Efectele stresului ocupaţional la şoferi în special la cei profesionişti sunt complexe şi costisitoare atât pentru societate cât şi pentru el şi familia lui: număr mare de zile de concediu de boală, risc crescut de incapacitate de muncă, necesitatea de schimbare a locului de muncă pe motive medicale (afecţiuni ale spatelui, tendoanelor şi încheieturilor, afecţiuni ale stomacului sau intestinelor, probleme mentale, insomnii sau somn ineficient şi afecţiuni cardiovasculare).

Lucrarea de faţă reprezintă prima etapă dintr-un studiu complex ce doreşte a monitoriza o serie de parametri fiziologici vitali ai conducătorilor auto pentru a putea depista din timp dificultăţile de concentrare,

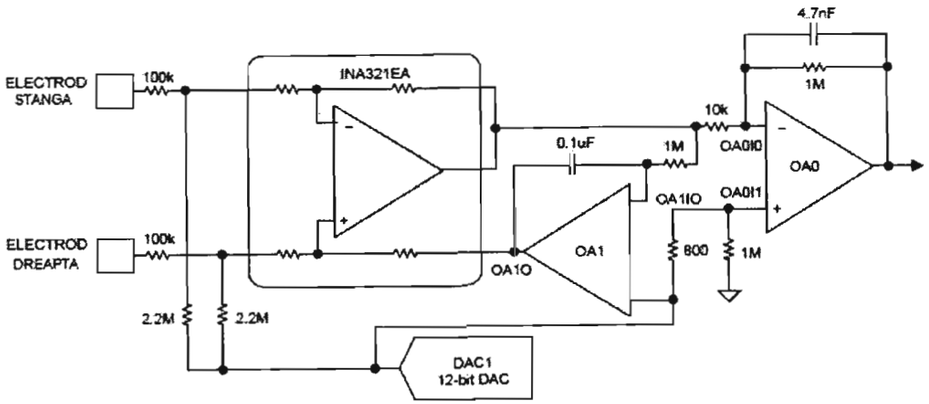


Fig. 1. Schema electrică a amplificatorului pentru semnal ECG (1)

alterarea timpului de reacţie şi a deciziei. În această primă etapă s-a avut în vedere monitorizarea variabilităţii ritmului cardiac corelat cu intensitatea traficului.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru monitorizarea biosemnalului ECG a fost proiectat un dispozitiv tip holter, care se deosebeşte de cele clasice prin faptul că foloseşte doar doi electrozi activi plasaţi pe volan, tocmai pentru a nu incomoda şoferul în timpul conduceriii autovehicolului.

În proiectarea amplificatorului s-a avut în vedere câteva cerinţe impuse de construirea dispozitivului:

- tensiunea de alimentare să fie aceeaşi cu cea a modulului digital;
- consumul să fie minim.

În consecinţă, semnalul de ieşire a fost amplificat la o valoare maximă, care să nu depăşească tensiunea de alimentare, folosind un amplificator de instrumentaţie specializat (INA322), într-o configuraţie care să asigure o amplificare G1=5 şi un al doilea etaj de amplificare OA0 existent pe cip-ul microcontrolerului MCS430 cu o amplificare setată G2=400. Ca urmare, de la valoarea semnalului de intrare, cuprins între 0,4 şi 2 mV, printr-o amplificare totală de G=14.000 s-a obţinut o valoare a semnalului de ieşire mai mică de 3,6 V cât a fost stabilită tensiunea de alimentare.

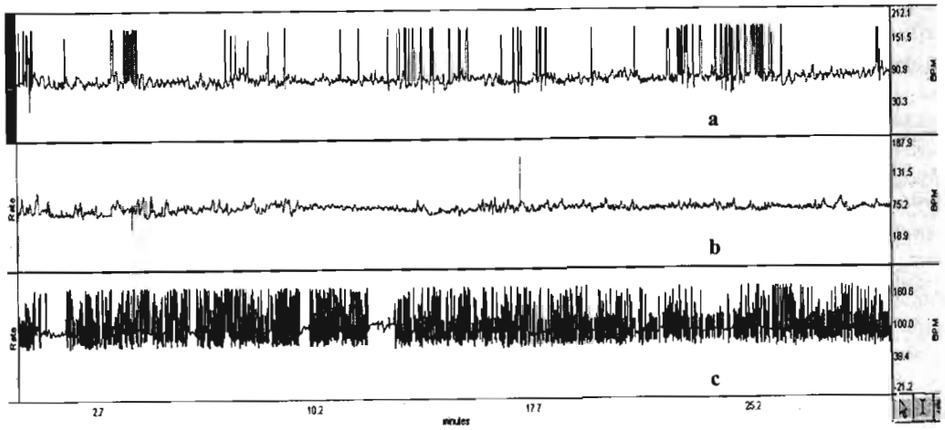


Fig. 2. Variaţia ritmului cardiac: a - şofer amator cu mai mult de 3 ani experienţă; b - şofer profesionist; c - şofer începător

Folosirea unei surse de alimentare simple de +3,6 V faţă de masă a impus introducerea unei tensiuni de referinţă, la care s-a raportat amplificarea, cu o valoare egală cu Vcc/2. Pentru a furniza această tensiune de referinţă s-a folosit convertorul digital analog existent în structura internă a microcontrolerului MCS 430. Schema electrică a amplificatorului este prezentată în fig. 1.

Pentru bucla de feed-back a fost folosit cel de-al doilea amplificator operaţional existent în structura internă a microcontrolerului MCS 430 (OA1) şi mai fost adăugat un filtru de "base-line".

Modulul digital realizează conversia analog digitală a semnalului stocarea acestuia pe un card de memorie tip SD/MMC şi comunicarea pe portul USB cu un computer pentru a putea descărca datele. Datele sunt stocate în memorie în format ASCII.

Studiul a inclus trei categorii de subiecţi: şoferi amatori cu mai mult de 3 ani experienţă, şoferi profesionişti şi şoferi începători. Monitorizarea s-a făcut pe o perioadă de 30 de minute pe un traseu cu trafic intens.

REZULTATE

În aceasta fază a studiului am demarat realizarea unei baze de date cu semnale ECG culese de la diverşi subiecţi în condiţii de trafic intens, condiţie ce amplifică stresul. Analiza s-a făcut pe grupuri de câte trei subiecţi, câte unul din fiecare categorie menţionată anterior. S-a observat că ritmul cardiac are o plajă de variaţie foarte mare la şoferii începători în contract cu variaţiile minore sesizate la şoferii profesionişti. Această situaţie este prezentată grafic în fig. 2.

DISCUŢII

Sistemul de monitorizare s-a dovedit a fi foarte comod pentru subiect, alegerea soluţiei de achiziţie a biosemnalului folosind doar doi electrozi şi plasarea acestora pe volan fiind inspirată.

CONCLUZII

Rezultatele preliminare sunt satisfăcătoare ceea ce ne determină să continuăm studiul luând în considerare şi alţi parametri care pot fi monitorizaţi pentru a obţine un rezultat pe baza căreia să se poată evalua gradul de oboseală la volan.

BIBLIOGRAFIE

1. Raju M. Heart rate and EKG monitor using the MSP430FG439. *Texas Instruments Application Note* 2005.
2. Pan J, Tompkins WJ. A real-time QRS detection algorithm. *IEEE Trans Biomed Eng* 1985; BME-32: 230–236.
3. Hamilton PS, Tompkins WJ. Quantitative investigation of QRS detection rules using the MIT/BIH arrhythmia database. *IEEE Trans Biomed Eng* 1986; BME-33: 1157–1165.
4. Li C, Zheng C, Tai C. Detection of ECG characteristic points using wavelet transforms. *IEEE Trans Biomed Eng* 1995; 32: 21–28,.
5. Barro S, Ruiz R, Cabello D, Mira J. Algorithmic sequential decision-making in the frequency domain for life threatening ventricular arrhythmias and imitative artefacts: A diagnostic system. *J Biomed Eng* 1989; 11: 320–328.

EVALUAREA DISTRIBUŢIEI DE TEMPERATURĂ TUMORALĂ ÎN HIPERTERMIA SUPERFICIALĂ CU MICROUNDE PRIN METODA ANALIZEI CU ELEMENT FINIT

Fl. Munteanu[1], Anca Munteanu[2], E. Bild[3]
Universitatea de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi
Facultatea de Bioinginerie Medicală
1 Disciplina de Biomecanică
2 Disciplina de Medicină Internă
Facultatea de Medicină
3 Disciplina de Oncologie Radioterapie

SUPERFICIAL MICROVAWE HYPERTHERMIA TUMORAL TEMPERATURE DISTRIBUTION BY USING FINITE ELEMENT ANALYSIS (Abstract): The main aim of this study is to present a virtual method for tumor temperature distribution by using finite element analysis. **Material and methods**: First step is geometrical synthesis that means tumor and neighbor structures three-dimensional reconstruction using CT sections; the second represent temperature and material synthesis: temperature values application and tissues density, thermal conductivity, specific heat values application, then finite element analysis. **Results**: Finite element analysis indicate tumor temperature distribution with maximum and minimum values as a result of microwave hyperthermia treatment. **Key words**: TUMOR, TEMPERATURE DISTRIBUTION, FINITE ELEMENT ANALYSIS

Metoda analizei cu element finit se aplică în tehnică în situaţiile în care nu se pot măsura direct anumiţi parametri precum starea de tensiuni, starea de deformaţii sau distribuţia de temperatură pentru un anumit corp. Metoda este utilizată frecvent şi în domeniul medical, generând informaţii deosebit de utile cu privire la anumiţi parametri biomecanici, mai ales în implantologie. Deoarece analiza cu element finit oferă şi posibilitatea de analiză termică, metoda poate fi extinsă şi pentru tratamentul prin hipertermie, în scopul determinării distribuţiei de temperaturi în volumul tumoral supus tratamentului.

Rezultatele experimentale obţinute în urma unui studiu in vitro, pe fantom de ţesut animal (1), indică distribuţia de temperatură pe suprafaţă şi în profunzime, dar pentru o zonă limitată din volumul considerat. Este destul de dificil de evaluat experimental distribuţia de temperaturi pe întreg volumul tumoral cu evidenţierea valorilor maxime şi minime, în condiţiile în care tumora trebuie încălzită într-un interval termic pentru care tratamentul cu microunde să fie eficient.

Scopul acestui studiu constă în utilizarea metodei analizei cu element finit pentru determinarea virtuală a distribuţiei de temperaturi într-un volum tumoral şi în ţesuturile învecinate, rezultată în urma aplicării hipertermiei superficiale cu microunde.

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru realizarea analizei cu element finit este obligatorie parcurgerea următoarelor etape: sinteza geometrică, sinteza proprietăţilor de material şi sinteza încărcărilor (2,3,4).

Sinteza geometrică Această etapă presupune realizarea unui model 3D a unei formaţiuni tumorale (recidivă de perete toracic). Cazul analizat este cel al pacientei A.M. de 63 de ani aflată în evidenţă oncologică din 1991 cu neoplasm mamar drept stadiul IIIB, la care s-a administrat chimioterapie neoadjuvantă (5 serii FEC), urmată de mastectomie radicală dreaptă, anexectomie bilaterală şi hormonoterapie (Tamoxifen 20 mg/zi). În 1994 a fost diagnosticată cu neoplasm mamar stâng, pentru care s-a intervenit chirurgical, practicându-se mastectomie radicală stângă urmată de hormonoterapie adjuvantă (durata totală a tratamentului cu Tamoxifen - 10 ani).

La examenul clinic din ianuarie 2007, pacienta prezenta cicatrice postmastectomie radicală dreaptă indurată la nivelul extremităţii interne - induraţie extinsă pe linia mediană, pe topografia sternului pe o lungime de aproximativ 4 cm, cu o zonă de aproximativ 2 cm^2 cu aspect violaceu; cicatrice postmastectomie radicală stângă de aspect normal, axilă bilateral, supraclavicular bilateral - normal clinic. Examenul CT toracic a evidenţiat la nivelul părţilor moi presternal şi paramedian drept o formaţiune expansivă solidă, hipodensă, hipercaptantă neomogen, de 5/4/6,5 cm cu extensie retrosternală şi posterior de cartilajele costale drepte, anterior până sub tegument; leziuni osteolitice de aproximativ 5-10 mm, contur neregulat, localizate la nivelul 1/3 inferioare a sternului, pe o lungime de 6,5 cm şi leziuni litice la nivelul cartilajelor costale adiacente drepte.

Reconstrucţia tridimensională s-a realizat cu ajutorul soft-ului AutoCAD 2007, pe baza secţiunilor CT toracic al pacientei prezentată anterior.

Pentru fiecare imagine, salvată într-un fişier separat, s-au trasat, cu ajutorul comenzii *polyline*, contururile toracelui extern, vertebrelor, coastelor, sternului şi recidivei tumorale. Ulterior aceste contururi au fost importate într-un fişier unic, poziţionându-se la distanţele corespunzătoare celor dintre secţiunile CT (10 mm).

Întrucât contururile obţinute nu sunt uniforme (au formă de poligon) se dă comanda *spline*, care transformă contururile poligonale în linii curbe. Odată poziţionate aceste contururi, se atribuie contururilor corespunzătoare fiecărei coaste, segmentului vertebral şi sternului culori şi layer-e distincte (straturi pe care se poate lucra separat).

Analiza cu element finit utilizează corpuri 3D generate în suprafaţă sau în solid. Deoarece reprezentarea are acurateţe mai mare, s-a ales ca modelul 3D să fie generat în solid, cu alte cuvinte să se obţină corpuri solide. Pentru aceasta se dă comanda *loft* în urma căreia contururile obţinute generează, pentru fiecare componentă menţionată anterior, un corp solid.

Pentru scheletul toracic s-au reconstruit pe rând: coastele, segmentul de coloană vertebrală (fără a pune în evidenţă vertebrele, întrucât fiind la distanţă de tumoră este puţin probabil să fie influenţate termic) şi sternul, folosindu-se pentru fiecare câte un layer separat. Practic, în timp ce se reconstruieşte un anumit element, celelalte sunt inactive prin comanda *freeze layer*. După ce s-au obţinut aceste corpuri, se activează toate layer-ele. Datorită simetriei, iniţial s-au generat numai coastele de pe partea dreaptă, cele de pe partea stângă obţinându-se cu ajutorul comenzii *mirror 3D*. În final se dă comanda *union*, care uneşte toate corpurile solide, generând un solid care reprezintă scheletul toracic. Pentru ca analiza în element finit să fie corectă, este necesar ca între cele trei corpuri create să nu existe suprapuneri de volum. Acest lucru se realizează prin comanda *substract*. În continuare se aduc cele trei corpuri împreună, în prima etapă scheletul toracic

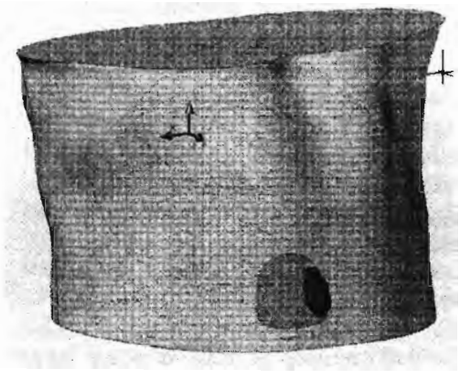


Fig. 1. Reunirea tuturor celor trei corpuri vizualizată cu opţiunea *X-ray mode*

şi tumora, la care se adaugă ulterior toracele (fig. 1).

Analiza cu element finit presupune discretizarea fiecărei structuri în elemente de dimensiuni mici care pot fi: paralelipipede, piramide şi tetraedre. Practic, fiecare element discret se comportă ca o entitate proprie având fiecare în parte caracteristici fizice proprii, dar aceleaşi cu ale structurii din care face parte. Atunci când se aplică o temperatură pe un nod (un colţ) al unui astfel de element, el o transmite elementelor învecinate (prin intermediul nodurilor) care la rândul lor o transmit mai departe în funcţie de conductivitatea structurii din care provine elementul. Discretizarea unei structuri se realizează prin mesh-area ansamblului rezultat.

Mai întâi se exportă fişierul care are incluse toate cele trei structuri cu extensia *sat*. Se accesează soft-ul Algor FEMPRO şi se deschide subrutina Superdraw, unde se importă fişierul menţionat anterior. Fiecare structură este identificată în Algor ca o entitate proprie atribuindu-i fiecăreia un *part* separat.

După ce se stabileşte tipul de analiză (*thermal*) se dă comanda *mesh*. Se alege o densitate mare de mesh-are pentru ca analiza să fie cât mai corectă. Este foarte important ca la contactul dintre două structuri (pe suprafeţele de contact) nodurile să se suprapună perfect.

Pentru atribuirea condiţiilor de material, se selectează part-ul specific structurii (tumoră, schelet toracic sau torace) şi se dă comanda *modify material*. În fereastra apărută trebuie specificate constantele densitate, conductivitate termică şi căldură specifică.

Sinteza proprietăţilor de material

Pentru atribuirea condiţiilor de material, se selectează part-ul specific structurii (tumoră, schelet toracic sau torace) şi se dă comanda *modify material*. În fereastra apărută trebuie specificate constantele densitate, conductivitate termică şi căldură specifică din tabelul I (5,6,7).

Sinteza temperaturilor

După ce s-au atribuit aceste valori, se aplică temperaturile. Acest lucru se realizează în funcţie de poziţionarea aplicatorului faţă de tumoră. Având în vedere faptul că tumora are dimensiunea maximă pe axul longitudinal (6,5 cm) aplicatorul se poziţionează cu dimensiunea maximă (16 cm) pe aceeaşi direcţie. În prima etapă s-au aplicat temperaturile de referinţă a ansamblului (37°C) şi a mediului (25°C). În etapa următoare, luând în considerare distribuţia de temperaturi obţinută pe fantomul din

TABELUL I

Valorile densităţii, căldurii specifice şi conductivităţii termice pentru ţesuturile corespunzătoare componentelor modelelor

Ţesut	Densitatea [kg/m^3]	Căldura specifică [J/(kg×°C)]	Conduct termică [J/(s×m×°C)]
Ţesut moale	965	3586	0,584
Os	1600	1400	0,650
Tumoră	1153	2894	0,612
Aer	1,3	0,001	0,004

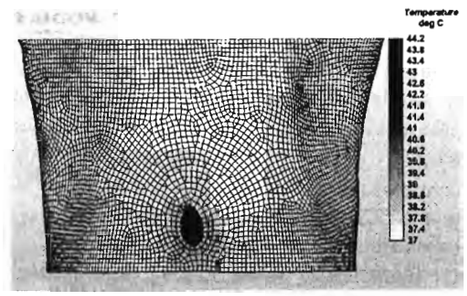


Fig. 2. Vizualizarea modelului în fereastra FEA Editor după mesh-are, sinteza condiţiilor de material şi sinteza temperaturilor

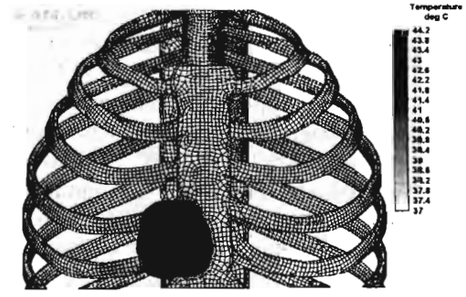


Fig. 3. Distribuţia de temperaturi pentru tumoră şi ţesutul osos adiacent

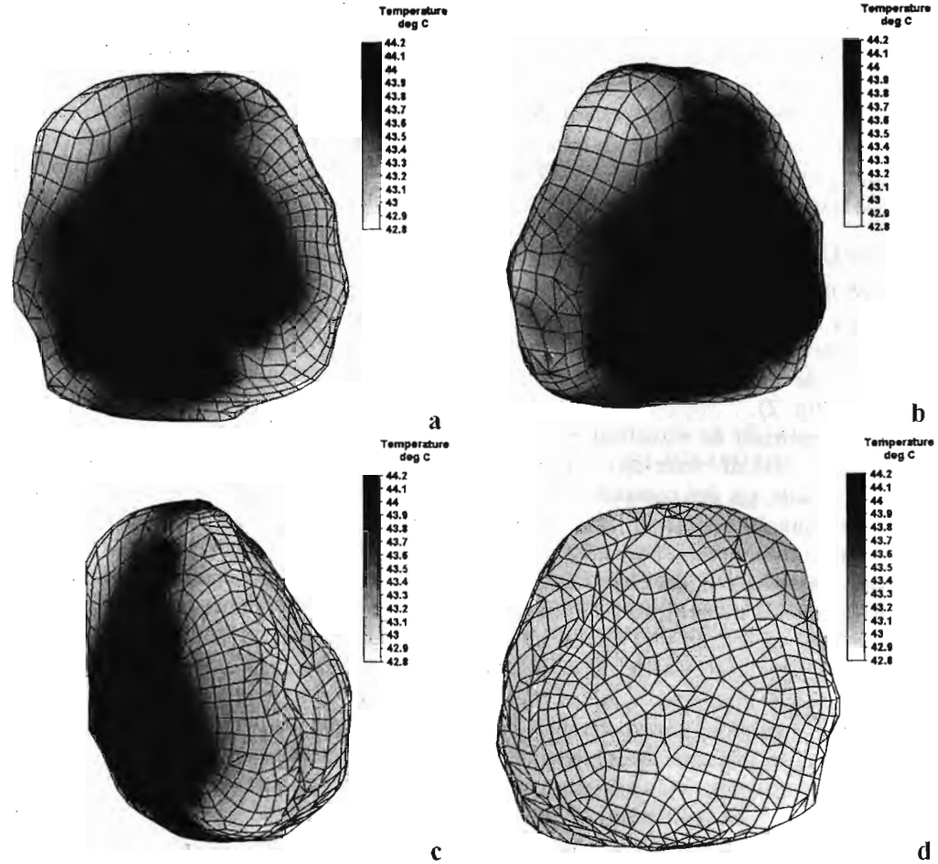


Fig. 4. a – vedere antero-laterală stângă; b – vedere frontală; c – vedere antero-laterală dreaptă; d – vedere posterioară

ţesut animal (1), s-au aplicat aceste temperaturi în nodurile corespunzătoare suprafeţei pe care încălzeşte aplicatorul (16 cm × 10 cm). Pe suprafaţa fantomului s-au identificat izoterme concentrice, cu valori cuprinse între 41°C şi 44,2°C. Suprafaţa corespunzătoare tumorii este mai puţin de 25% din suprafaţa aplicatorului (6,5 cm × 5 cm) şi, în condiţiile în care aplicatorul este centrat pe volumul tumoral, temperaturile înregistrate la nivelul acesteia au valori cuprinse între 42,8°C şi 44,2°C. După atribuirea condiţiilor de material şi aplicarea temperaturilor, s-a trecut la următoarea etapă şi anume cea de analiză propriu-zisă. Se dă comanda *Analise*, rezultatul fiind distribuţia de temperaturi pe fiecare structură în parte. Distribuţia de temperaturi este continuă, fără variaţii mari la nivelul unei structuri, în schimb între structuri pot exista salturi de temperatură datorită caracteristicilor termice diferite (8,9).

REZULTATE

Distribuţia temperaturilor indică, la suprafaţa toracelui, în zona tumorală, valori mai mari ale temperaturii pentru tumoră şi destul de mici la nivelul tegumentului adiacent (fig. 2).

Este important de vizualizat fenomenul termic la nivelul interfeţei tumoră-os. Pentru aceasta s-a dat comanda *hide* partului corespunzător toracelui, rămânând în acest fel active numai scheletul toracic şi tumora. Temperaturile au o distribuţie continuă la nivelul tumorii, valorile fiind cuprinse între 42,8°C şi 44,2°C. Există şi o influenţă asupra osului, astfel, în zona învecinată tumorii temperatura atinge valoare de 38,4°C, mai ales în zona sternului, scăzând radial în punctele îndepărtate de tumoră, până la temperatura corpului, căreia i s-a atribuit, ca o condiţie iniţială, valoarea de 37°C. Temperatura maximă înregistrată în ţesutul osos adiacent nu este susceptibilă să inducă efecte adverse severe (fig. 3).

Analiza cu element finit are ca scop principal determinarea distribuţiei de temperaturi în tumoră. Pentru a izola tumora de celelalte structuri s-a dat comanda *hide* part-urilor care corespund toracelui şi scheletului toracic. Tumora are temperaturile cele mai mari (valori cuprinse între 43,9°C şi 44,2°C) în regiunea anterioară (fig. 4a), care este cea mai apropiată de aplicator.

Temperatura scade gradat către periferie ajungând la valoarea de 43,1°C, fapt datorat, pe de o parte, scăderii temperaturii de la centrul aplicatorului către periferie, iar pe de altă parte, creşterii distanţei aplicator-suprafaţă tumorală periferică, din cauza geometriei tumorii (fig. 4 b,c). Pe suprafaţa posterioară temperatura scade până la valorea de 42,8°C, lucru explicabil prin distanţa mare între această suprafaţă şi suprafaţa aplicatorului (4 cm), încălzirea la acest nivel făcându-se atât ca urmare a efectului direct al microundelor, cât şi datorită fenomenelor de conducţie termică care sunt mai mari la periferia tumorii decât în centru (fig. 4d).

Distribuţia de temperaturi în tumoră are un grad de continuitate, întrucât nu se întâlnesc concentratori de temperatură.

CONCLUZII

În urma determinării distribuţiei de temperaturi în volumul tumoral utilizând analiza cu element finit, pot fi formulate următoarele concluzii.

Datele privind distribuţia de temperatură în volumul tumoral obţinute cu ajutorul modelului teoretic sunt concordante cu cele experimentale *in vitro*. Se înregistrează aproximativ aceeaşi variaţie de temperatură în adâncime (la 2 cm profunzime scăderea de temperatură este de aproximativ 0,9°C, spre deosebire de experimentul *in vitro* unde, pe fantom de ţesut animal, s-a înregistrat o scădere de 0,7°C). Valorile temperaturii sunt în intervalul de tratament recomandat în hipertermie, media temperaturilor fiind

de (44,2+42,8)/2 = 43,5°C. Metoda analizei cu element finit oferă informaţii importante asupra valorilor temperaturilor care se înregistrează la sfârşitul unui ciclu de tratament cu hipertermie (de aproximativ 30 min). Deşi nu necesită introducerea unui număr mare de date, rezultatele obţinute prin modelarea prin analiză cu element finit au un grad de precizie ridicat. Metoda oferă o imagine de ansamblu a distribuţiei de temperatură atât în suprafaţă, cât şi în întreg volumul tumoral şi în ţesuturile adiacente.

BIBLIOGRAFIE

1. Munteanu A, Munteanu Fl, Bild E. Hipertermia superficială cu microunde - parametri fizici de tratament determinaţi pe fantom experimental. *Rev Med Chir* 2007; 111 (3): 691-695.
2. Gârbea D. *Analiză cu elemente finite*. Bucureşti: Ed. Tehnică, 1990.
3. Cook RD. *Concepts and applications of finite elenent analysis*. New York: John Wiley, 1999, 45-84.
4. Iordache F, Băltăreţu F. *Modelarea şi simularea proceselor dinamice de transfer termic*. Bucureşti: Ed. Matrix Rom, 2002, 23-59.
5. Myerson RJ, Moros E, Roti Roti J. Hyperthermia. In: *Principles and Practice of Radiation Oncology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, 1998, 645-646.
6. Vrba J, Lapes M, Oppl L. Technical aspects of microwawe thermotherapy. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1999; 48: 305-309.
7. Mason PA, Hurt WD, Walters TJ et al. Effects of frequency, permittivity, and voxel size on predicted specific absorption rate values in biological tissue during electromagnetic-field exposure. *Microwave Theory and Techniques* 2000; 11 Part 2: 2050- 2058.
8. Groşan TS. *Transfer convectiv şi radiativ de căldură în medii poroase*. Cluj-Napoca: Ed. Casa Cărţii de Ştiinţă, 2004, 13-89.
9. Chiriac F, Ilie A, Dumitrescu R. *Complemente de transfer de căldură şi masă*. Ed. A.G.I.R., 2006, 154-156.

NOUTĂŢI

FLAVAGLINE ŞI TRITERPENOIDE DIN FRUNZELE DE *AGLAIA FORBESII*

Genul *Aglaia* (*Meliaceae*) cuprinde aproape 100 specii răspândite mai ales în pădurile tropicale din sud-estul Asiei. Studii recente au evidenţiat faptul că speciile aparţinând acestui gen conţin flavagline şi bisamide; pentru unii dintre aceşti compuşi au fost evidenţiate efecte antivirale, antifungice, anticanceroase, antiinflamatoare, precum şi proprietăţi insecticide. Din scoarţa de *Aglaia forbesii* King, Joycharat et al. au izolat trei noi flavagline cu structură benzopiranică: desacetilpiramidaglainele A, B, C (1-3), o nouă triterpenă cu structură de tip cicloartan: 23,24,25-trihidroxicicloartan-3-onă (4), doi steroli cu structură de tip pregnan: 2 beta, 3 beta-dihidroxi-5-alfa-pregn-17 (Z)-en-16-onă (5) şi 2 beta, 3 beta-dihidroxi-5-alfa-pregn-17 (E)-en-16-onă (6). Structura compuşilor izolaţi a fost elucidată prin spectroscopie RMN (1D şi 2D) şi spectrometrie de masă. De asemenea, a fost testată activitatea compuşilor 3, 4, 5 şi 6 faţă de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra şi faţă de virusul *Herpes simplex* de tip 1. Flavaglina 3 (desacetilpiramidaglaina 3) s-a dovedit activă faţă de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra având M.I.C. = 25 microg/ml (compuşii cu M.I.C. sub 200 microg/ml sunt consideraţi activi) (Joycharat N, Greger H, Hofer O, Saifah E. Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. *Phytochemistry* 2008; 69: 206-211).

Anca Miron

ZILELE MEDICINEI DENTARE IEŞENE

CONGRESUL INTERNAŢIONAL DE MEDICINĂ DENTARĂ ORGANIZAT CU OCAZIA ZILELOR FACULTĂŢII DE MEDICINĂ DENTARĂ IAŞI

Editia a XII-a

Centrul Univesitar Iaşi a fost gazda unui amplu eveniment ştiintific din teritoriul Medicinii dentare - **Congresul Internaţional de Stomatologie**. Tema principală a manifestării a fost **"Medicina Dentară între realitate şi paradigmă"** iar lucrările s-au desfăşurat în cadrul „Zilelor Facultăţii de Medicină Dentară" Iaşi, ajunse la ediţia a XII-a. Congresul a avut loc în perioada 13-15 martie 2008, sub preşedinţia Dnei. Prof. Univ. Dr. Norina Consuela Forna, Decanul Facultăţii de Medicină Dentară, din cadrul Universităţii de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" Iaşi. Preşedinte de onoare al congresului a fost Prof. Univ. Dr. Yves Comissionat, personalitate remarcabilă a lumii medicale mondiale, Profesor Universitar, Universitatea Paris 5, Franţa, Ofiţer al Legiunii de Onoare, Membru de onoare al Colegiul Medical Paris.

Înalta ţinută academică şi eleganţa acestui eveniment ştiinţific au fost date de prezenţa a peste 20 nume de prestigiu din constelaţia medicinii dentare internaţionale.

Caracterul profund ştiintific al manifestării a fost întărit de prezentarea ultimelor cuceririri ale ştiinţei în teritoriul medicinii dentare, noutăţi oferite participanţilor de personalităţile de prestigiu, reprezentanţi ai şcolilor de profil din Franţa, Italia, Israel, Belgia, Germania, Elveţia.

Renumiţii profesori prezenţi la Congres

au prezentat cursuri şi prelegeri contribuind astfel la ridicarea nivelului ştiinţific şi al exigenţelor activităţii practice mondiale.

Caleidoscopul ştiinţific a oferit participanţilor soluţii de avangardă ale Medicinei Dentare pe fiecare entitate clinică în cadrul conferinţelor, sesiunilor ştiinţifice, prezentărilor de produse şi de hands-on. În acelaşi timp, au fost prezentate soluţiile terapeutice cotidiene şi dificultăţile pe care trebuie să le surmonteze practicianul în căutarea variantei terapeutice perfecte.

Înfiinţarea, pentru prima dată în România, a unei Asociaţii Dentare pentru Educaţie, constituie un nou început pentru racordarea şi uniformizarea învăţământului stomatologic românesc în deplin acord cu standardele internaţionale. Faptul că membrii fondatori ai acestei asociaţii sunt decanii facultăţilor de Medicină Dentară din România constituie o premisă certă pentru caracterul naţional al acestei asociaţii. Materializarea obiectivelor promovate de noul organism ştiintific va conduce cu certitudine la un învăţământ competitiv, bazat pe elemente de similaritate curriculară, aspect cu profund impact în practica stomatologică.

Un pas la fel de important va fi afilirea Asociaţiei Dentare Române pentru Educaţie (ADRE) la Asociaţia Dentară Europeană pentru Educaţie (ADEE).

Congresul de la Iaşi a fost o bună ocazie pentru înfiinţarea Asociaţiei Române de Reabilitare Orală, reper notabil pentru viaţa profesională, promovând conceptul integrativ holistic de abordare a patologiei orale.

Realizarea unui hands-on în domeniul complex al reabilitării orale implanto-protetice, caracterizat de un înalt grad de dificultate, a suscitat interesul practicienilor din domeniu, realizarea practică a etapei de amprentare şi utilizarea ultimelor accesorii implanto-protetice constituind o condiţie esenţiala de implementare a unui algoritm terapeutic riguros.

Nu putem vorbi de un rezultat clinic de succes decât în momentul în care echipa stomatologică medic-stomatolog-tehnician dentar-asistentă medicală sunt ancoraţi în egală măsura la ultimele noutăţi clinico-tehnologice. În acest spirit, în cadrul evenimentului ştiinţific au fost susţinute cursuri postuniversitare pentru tehnicieni dentari şi asistente de stomatologie, de către personalităţi din ţară care au aprofundat probleme fundamentale pentru ambele profesii.

În acelaşi cadru academic, expoziţia de materiale dentare şi aparatură, dublată de prezentări ale produselor promovate, a adus în faţa practicianului noutăţi legate de biomateriale, noi linii tehnologice, fără a eluda instrumentarul modern ce apropie practica stomatologică de paradigmă, aspect ce se regăseşte în tematica congresului.

Cadrul legislativ internaţional şi problemele de etică au fost dezbătute în cadrul unei mese rotunde la care au participat reprezentantul Federaţiei Dentare Internaţionale, Prof. Dr. Gerhard Seeberger, reprezentanţi ai Colegiului Naţional al Medicilor Dentişti din România şi Colegiul Medicilor Dentişti din Iaşi, precum şi reprezentantul Casei Naţionale de Asigurări de Sănătate.

Amplul program ştiinţific s-a desfăşurat între 13 şi 15 martie în Aula "Mihai Eminescu" a Universităţii "Al.I. Cuza", în Aula "Gh. Asachi" a Universităţii Tehnice Iaşi şi în Amfiteatrul "Lorica Gavriliţă" al Universităţii de Medicină şi Farmacie "Gr.T. Popa" şi în Laboratorul de simulatoare.

Congresul a reunit teme de maxim interes pentru medicul stomatolog, al cărui pregătire competitivă este un deziderat esenţial în cadrul procesului de educaţie medicală continuă, prelegerile fiind susţinute de personalităţi remarcabile ale medicinii dentare internaţionale, dezvoltând acelaşi concept al medicinii dentare între realitate şi paradigmă:

1. **Prof. Univ. Dr. Commissionat Yves** – Membru de Onoare al Colegiului Medical, Paris, specialitatea Implantologie orală, Universitatea Paris 5, Franţa

2. **Prof. Univ. Dr. Seeberger Gerhard Konrad** – Preşedinte ERO-FDI (European Regional Organization of World Dental Federation Working Group), specialitatea Implantologie orală, Italia

3. **Prof. Univ. Dr. Garfunkel Adi** –Profesor Asociat al Colegiului Medical Pennsylvania, Decan Emerit al Facultăţii de Medicină Dentară, Hadassah Hebrew University, Israel

4. **Prof. Ciausu Gabi** - Şeful Departamentului de Chirurgie Oro-Maxilo- Facială, Tel Aviv, Israel

5. **Prof. Dr. Wember-Matthes Dieter** – specialist în Implantologie, Germania

6. **Conf. Doron Haim** – specialist în Reabilitare implanto-protetică, Israel

7. **Dr. Bou Saba Sami** – specialist în Ortodonţie şi Ortopedie dento-facială, Universitatea Catolică Louvain, Belgia

8. **Dr. Jurgen Andre** – specialist în Protezările nemetalice şi Terapii ortodontice nonextracţionale, Germania

9. **Dr. Werner Harald** – specialist în Biomateriale dentare, Germania

10. **Dr. Geserik Marc** – specialist în Ortodonţie şi Ortopedie dento-facială, Germania.

Arealul problematicilor dezvoltate în cadrul programului ştiinţific al evenimentului moldav a fost divers, guvernat de elucidarea ecuaţiei ce reuneşte aspectele reale şi ideale ale medicinii dentare, pe fiecare entitate clinică, reflectat în cele 49 de conferinţe, în 9 sesiuni ştiinţifice, 6 prezentări de firmă şi o secţiune hands-on.

Lucrările Congresului au abordat teme de mare actualitate din domeniul implantologiei orale, al proteticii dentare şi reabilitării orale, dar au fost detaliate şi tematici aflate la confluenţa cu alte domenii medicale. O temă novatoare în acest sens este dezbaterea interdisciplinară „Tehnici de prevenire şi renunţare la fumat".

O latură importantă a tematicii a fost focalizată pe rolul biomaterialelor de regenerare tisulară şi restaurări estetice, cele din urmă asociate metodelor şi tehnologiilor avangardiste, cu profund impact în succesul terapeutic.

Partea teoretică a Congresului a fost consemnată în două publicaţii ce reunesc lucrările ştiinţifice prezentate: un supliment al Revistei Medico-Chirurgicale, ce

reuneşte 117 lucrari şi o carte realizată cu sprijinul Autorităţii Naţionale de Cercetare, reunind 65 de articole.

Paleta largă de conferinţe, susţinute de personalităţi ale lumii ştiinţifice internaţionale şi naţionale, la care se adaugă mesele rotunde ancorate în teritoriul legislativ al practicii stomatologice, precum şi în sfera interferenţelor specialităţilor (un exemplu concludent fiind cea dedicată tabacologiei şi implicaţiilor în patologia orală), un număr de 6 sesiuni ştiinţifice consacrate fiecărei specialităţi în parte, fără a eluda secţiunea hands-on dedicată reabilitării implanto-protetice şi expoziţia de materiale dentare şi aparatură, oferă imaginea posibilităţilor concrete prin care cei peste 500 de participanţi la manifestare şi-au îmbogăţit cunoştinţele teoretice şi practice.

Prof. Univ. Dr. Norina Forna

Decan al Facultăţii de Medicină Dentară
Iaşi

IN MEMORIAM

PROF. DR. MIRCEA ZAMFIR
(1 aprilie 1947 - 14 februarie 2008)

Ne-a părăsit un suflet mare

În zorii zilei de 14 februarie 2008 a încetat să mai bată inima mare şi caldă a celui care a fost Prof. dr. Mircea Zamfir. Anatomia şi medicina ieşeană au devenit mai sărace prin trecerea prematură în nefiinţă a acestui suflet nobil. S-a stins fulgerător, atunci când era mai mare nevoie de domnia sa, o personalitate cu un caracter de excepţie, un luptător înnăscut, un om puternic care a ştiut să dăruiască lucruri frumoase şi trainice până la ultima suflare.

S-a născut la Iaşi, în ziua de 1 aprilie 1947, părinţii săi fiind dascăli respectaţi şi iubiţi în Belceşti, „cea mai mare comună din Moldova", cum spunea mereu cu mândrie, loc în care au adus lumină şi dragoste de carte şi au deschis minţile şi sufletele la atâtea generaţii de elevi. În perioada 1960-1964 urmează cursurile liceului internat „C. Negruzzi", perioadă de care îşi amintea întotdeauna cu plăcere, chiar dacă acei ani au fost destul de grei pentru familia sa. S-a mândrit întotdeauna că poartă amprenta de negruzzist, iar fiicele sale calcă pe aceleaşi urme. A fost onorat de cinstea de a fi ales preşedintele Comitetului de părinţi la nivelul Colegiului.

În 1970 a absolvit Facultatea de Medicină din Iaşi. Nu îi uită pe cei din mijlocul cărora plecase şi în perioada 1970-1973 este medic coordonator al Centrului de sănătate din Belceşti, aducând alinare suferinţei belceştenilor săi dragi. Nici aceştia nu l-au uitat şi i-au oferit diploma de „Cetăţean de onoare" şi l-au însoţit pe ultimul său drum. Adolescenţa, anii de liceu, de facultate şi de stagiu i-au dat posibilitatea să cunoască mulţi oameni şi să-şi facă mulţi prieteni. Nu era om care să apeleze la Profesor şi care să nu primească un sfat bun, un cuvânt de încurajare şi, de cele mai multe ori, o soluţie la problema avută.

Marcat de amprenta vocaţională de dascăl a părinţilor săi, în 1973 devine, prin concurs, asistent stagiar la Catedra de Anatomie. Din acel an şi până la sfârşitul vieţii profesorul Mircea Zamfir se identifică cu destinul anatomiei ieşene şi româneşti. Parcurge toate treptele ierarhiei universitare (o perioadă mare de timp,16 ani, datorată acelor vremuri, fiind asistent universitar), în 1995 ajungând profesor universitar. Concomitent îşi completează pregătirea şi formarea profesională şi în reţeaua sanitară, lucrând ca medic primar obstetrică-ginecologie în Maternitatea „Elena Doamna". În acea perioadă urmează un curs de specializare la Institutul Oncologic din Cluj, fiind remarcat de renumitul profesor Chiricuţă. Primeşte o propunere extrem de tentantă pentru a rămâne la Cluj, dar nu acceptă. Profesorul Mircea Zamfir era prea ataşat de Iaşul său drag şi de tot ceea ce reprezenta acesta în sufletul său.

În 1985 devine doctor în ştiinţe. Are marea şansă ca, în formarea sa ca anatomist, să fie influenţat şi modelat de trei maeştri, trei mari profesori: Ioan Iancu, Ion Petrovanu şi Mircea Chiriac. Şi profesorul Mircea Zamfir nu a ratat această şansă unică, într-o perioadă în care cei care pot şi vor să modeleze caractere sunt din ce în ce mai puţini. A încercat să ia cât mai multe lucruri bune de la fiecare. Cu ultimii doi a colaborat în editarea unor cărţi de referinţă în domeniu: „Emisfere cerebrale. Sisteme informaţionale" (cu profesorul Petrovanu) şi „Anatomia trunchiului" (cu profesorul Chiriac). Profesorul şi-a respectat şi iubit mult maeştrii. Nu pot uita cât de frumos vorbea şi cu câtă generozitate şi delicateţe s-a purtat cu profesorul Chiriac, câtă stimă şi recunoştinţă avea pentru profesorul Petrovanu.

A fost prodecan al Facultăţii de Medicină, şeful Catedrei de Anatomie, directorul Institutului de Anatomie, vicepreşedintele Societăţii Române de Anatomie, preşedintele secţiei de Anatomie a S.M.N., redactor şef al Revistei Române de Anatomie (revistă pe care a înfiinţat-o la Iaşi, în 2002 şi a adus-o în categoria B a CNCSIS), membru în diferite societăţi ştiinţifice internaţionale de prestigiu, conducător de doctorat.

A reuşit să adune lângă domnia sa un colectiv de tineri anatomişti de valoare care l-au iubit şi respectat, prin care a încercat să readucă anatomiei ieşene prestigiul de care se bucura înainte. Profesorul ştia că nici o instituţie, oricât de glorios i-ar fi trecutul, nu este nimic fără oameni şi martorii acestei şcoli sunt atâtea generaţii de studenţi care au avut şansa să facă anatomia cu domnia sa. Mulţi dintre ei au fost alături de profesorul lor drag şi pe ultimul său drum.

Profesorul a iubit mult Institutul de Anatomie şi oamenii de aici. Au fost veri şi concedii, în perioada extinderii şi consolidării institutului, pe care le-a petrecut împreună cu maiştrii şi cu muncitorii, pentru ca să fie totul bine şi Institutul de Anatomie să recapete strălucirea de altădată. Nimic nu se uită. Şi zidurile păstrează amintirile. În seara în care trupul neînsufleţit al Profesorului a plecat spre biserică, Institutul de Anatomie era aşa de frumos iluminat, parcă în amintirea sa. Păcat că nu a mai apucat să vadă şi acest lucru. În memoria sa şi a lucrurilor bune pe care le-a făcut, una din sălile institutului îi va purta numele.

Profesorul Zamfir a fost un coleg respectat şi iubit şi în ţară şi în străinătate. De neuitat va rămâne Congresul de Anatomie de la Iaşi, din 2002, al cărui preşedinte a fost. A pus bazele protocolului de colaborare între U.M.F. Iaşi şi Universitatea din Palermo.

Mircea Zamfir, înainte de toate, a fost însă un OM deosebit. Un fiu care şi-a venerat şi ascultat cu sfinţenie părinţii, un tată care şi-a adorat fiicele şi s-a mândrit cu performanţele lor, un soţ mereu atent şi protector, un frate ca nimeni altul. Profesorul a avut o inimă mare şi iubitoare pentru toţi cei dragi din familie. Cine a văzut sfâşietoarea durere a distinsei sale mame poate ar conştientiza mai uşor că în această viaţă pământească totul este trecător şi că nu merită să ne purtăm decât cu omenie între noi.

Mircea Zamfir a fost şi un prieten minunat. Avea suflet mare şi generos. Se implica cu dăruire în tot ceea ce făcea, uneori cu prea multă patimă. Căuta întotdeauna soluţia cea mai bună, avea o vorbă bună pentru fiecare. Chiar dacă nu se înţelegea cu cineva, găsea până la urmă calea de a da mâna cu persoana respectivă. Nu era ranchiunos, sufletul său mare nu ţinea supărarea. Indiferent de sentimentele pe care i le purtai, Profesorul Zamfir a fost un om pe lângă care nu puteai trece fără să nu-l iei în seamă. Şi nu statura sa era cea impozantă ci felul său de a fi ca om. Cabinetul său era deschis pentru oricine. Avea ceva special, care făcea ca sufletul tău să se aglutineze de al domniei sale. Dacă îl cunoşteai cu adevărat nu te mai puteai despărţi de el.

Îi plăcea mult natura şi tot ceea ce era autentic românesc, era un pescar şi vânător pătimaş. Aştepta întotdeauna cu nerăbdare primăvara. În luna mai ar fi trebuit să prezideze Congresul Naţional de Anatomie. Însă primăvara nu l-a mai aşteptat.

Toţi prietenii săi din ţară şi străinătate, pentru care Iaşul însemna şi Mircea Zamfir, vor veni în mai la Iaşi, să urce dealul înmiresmat al Copoului, să-i cinstească memoria şi să verse o lacrimă pentru sufletul său bun.

Timpul îşi aşterne pulberea peste ani şi amintiri. Adevărata valoare a unui om este dată de cei care îşi aduc aminte cu drag de acea persoană. Şi confirmarea faptului că Mircea Zamfir a fost un OM deosebit a venit în ziua de 1 aprilie. Sute de lumânări aprinse şi buchete de flori, multe aduse de anonimi, au acoperit mormântul Profesorului.

Noi, ceilalţi, rămaşi deocamdată aici, îl vom pomeni cu dragoste şi dor pentru tot ceea ce a reprezentat în această lume trecătoare.

Dumitru Păduraru

EVOCĂRI

CONF. DR. GHEORGHE CĂLIN
(1 august 1927 - 25 ianuarie 1997)

Născut în oraşul Paşcani urmează aici cursurile şcolii primare, iar apoi pe cele ale liceului „Aurel Vlaicu" din Bucureşti, pe care le absolvă în anul 1946. Între anii 1947-1953 frecventează cursurile Facultăţii de Medicină din Iaşi, pe care le absolvă cu „Diplomă de merit", motiv pentru care este reţinut în învăţământul superior medical în calitate de preparator principal la disciplina Obstetrică şi Ginecologie din cadrul Institutului de Medicină şi Farmacie din Iaşi. Pentru rezultate excepţionale este promovat asistent universitar, şef de lucrări, apoi conferenţiar universitar la Catedra de Obstetrică şi Ginecologie.

Concomitent cu activitatea didactică, ştiinţifică şi metodologică, prestează o valoroasă muncă spitalicească în cadrul prestigioasei Clinici Universitare de Obstetrică şi Ginecologie din Iaşi, îndeplinind pe rând funcţiile de medic secundar, specialist, primar şef de secţie. Aceste titluri le dobândeşte pe bază de concurs afirmându-se astfel, din tinereţe, ca un specialist competent, talentat şi unanim apreciat.

În anul 1969, conf. univ. dr. Gheorghe Călin a efectuat o specializare la Paris, interesat de problematica întreruperilor spontane a evoluţiei sarcinii, precum şi de incompetenţa cervico-istmică. La sfârşitul perioadei de specializare, specialiştii francezi au apreciat elogios activitatea prestată de doctorul Gheorghe Călin călduros menţionată în referinţele oficiale trimise în ţară.

În domeniul cercetării ştiinţifice, între anii 1953-1997, conf. univ. dr. Gheorghe Călin a abordat cu predilecţie problemele practice ale specialităţii, fără a neglija şi pe cele legate de cercetarea fundamentală. În acest sens, sunt de subliniat contribuţiile remarcabile în domeniul Obstetricii şi Ginecologiei, respectiv peste 60 de lucrări prezentate în cadrul unor congrese naţionale şi internaţionale, la diferite alte manifestări. Dintre acestea, peste 30 au fost publicate în revistele „Obstetrică şi Ginecologie", „Viaţa medicală", „Revista Medico-Chirurgicală", precum şi în volumele congreselor şi sesiunilor ştiinţifice din ţară şi de peste hotare etc. Majoritatea lucrărilor tratează probleme de endocrinologie obstetricală şi ginecologică şi de hormonoterapie.

De asemenea, conf. univ. dr. Gh. Călin a realizat studii colaborative privind dozarea steroizilor sexuali în diagnosticul avortului endocrin, şi habitual şi a contribuit, în calitate de coautor, la elaborarea cursurilor de specialitate ale Clinicii.

În mod deosebit, conf. univ. dr. Gheorghe Călin s-a dăruit cu pasiune îndrumării lucrărilor de diplomă a zeci de absolvenţi ai Facultăţii de Medicină. Şi-a consacrat întreaga energie şi competenţă asistării la naştere a sute de femei gravide, salvându-le deseori viaţa.

Fiind legat de oraşul său natal Paşcani a asigurat pentru multă vreme îndrumarea metodologică a reţelei de specialitate contribuind, atât preventiv cât şi terapeutic, la optimizarea stării de sănătate a populaţiei oraşului în care a văzut lumina zilei. Sentimentele sale deosebite pentru oraşul Paşcani aveau şi o motivaţie specială: aici a funcţionat peste zece ani, soţia sa, dr. Elena Călin-Marinescu şi tot aici a avut colegi de facultate şi buni prieteni, pe regretaţii dr. Teodor Alexandrescu şi dr. Tiberiu Pompaş.

Conf. univ. dr. Gheorghe Călin a rămas în memoria celor care l-au cunoscut, ca fiind un *Om*, iubit şi respectat, un specialist de prestigiu în domeniul Obstetricii şi Ginecologiei, un cadru didactic cu vocaţie pedagogică.

Prof. univ. dr. C. Gh. Marinescu

INSTRUCŢIUNI PENTRU AUTORI

Revista Medico-Chirurgicală a Societăţii de Medici şi Naturalişti din Iaşi publică articole originale (de cercetare fundamentală şi clinică), articole tip trecere în revistă (review) şi actualităţi (update), articole tip prezentare de caz, note clinice şi experimentale, recenzii, articole tip scrisoare către editor, informări asupra unor reuniuni ştiinţifice etc. în domeniul medicinii şi în domeniile conexe. Nu sunt acceptate materiale publicate sau în curs de publicare în alte reviste, cu excepţia lucrărilor publicate în rezumat.

Pentru **articolele originale** conţinutul trebuie structurat în următoarele secţiuni: INTRODUCERE, MATERIAL ŞI METODĂ, REZULTATE, DISCUŢII, CONCLUZII, MULŢUMIRI, BIBLIOGRAFIE.

Secţiunea Introducere (i) oferă suportul de informaţii care susţine, în baza literaturii de specialitate, subiectul vizat şi (ii) indică scopul pentru care a fost realizată cercetarea, subliniind elementele de noutate prin care se individualizează aceasta.

Secţiunea Material şi metodă include date precise, reproductibile şi verificabile, asupra materialul studiat, elementelor testate şi criteriilor de evaluare.

Secţiunea Rezultate prezintă, concis, datele obţinute (inclusiv sub formă de tabel sau figuri). În raport de scopul urmărit, acolo unde este cazul, rezultatele sunt validate printr-o prelucrare statistică adecvată. Textul acestei secţiuni va fi scris utilizând timpul trecut.

Secţiunea Discuţii urmăreşte interpretarea rezultatelor obţinute în cercetarea realizată, semnificaţia lor ştiinţifică fiind analizată în raport cu lucrările altor autori dedicate aceluiaşi subiect şi raportate în fluxul principal de publicaţii.

Secţiunea Concluzii subliniază aportul adus de cercetare în progresul cunoştinţelor în domeniu.

Secţiunea Mulţumiri include numele unor instituţii, organizaţii sau persoale care au contribuit decisiv în realizarea studiului.

Articole tip **trecere în revistă** (review) şi **actualităţi** (update) asupra unor subiecte de interes sunt în principal solicitate de editori, fiind însă luate în considerare, în sistem de peer-review, şi cele primite de la autori.

Pentru articolele tip **prezentare de caz**, conţinutul trebuie structurat în următoarele secţiuni: INTRODUCERE, PREZENTAREA CAZULUI, DISCUŢII.

PREGĂTIREA MANUSCRISULUI

Pregătirea manuscrisului se va face în conformitate cu instrucţiunile publicate în: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (1994) *Lancet* 1996; 348; V2; 1-4.

Textul va fi scris cu fonturi Times New Roman 12 pts. Revista foloseşte ortografia cu *â* şi *sunt*. Numerotarea paginilor se face în partea din dreapta jos.

Abrevierile nu trebuie utilizate excesiv şi trebuie explicate la prima apariţie în text.

Materialele nu vor depăşi: articole originale - 6 pagini/2500 cuvinte; articole tip trecere în revistă (review) şi actualităţi (update) - 8 pagini/3500 cuvinte; articole tip prezentare de caz - 4 pagini/1700 cuvinte; note clinice şi experimentale - 3 pagini/1300 cuvinte; recenzii, articole tip scrisoare către editor, informări asupra unor reuniuni ştiinţifice - o pagină/450 cuvinte. Revista îşi rezervă dreptul unor modificări impuse de tehnoredactare şi aranjare în pagină.

Manuscrisele respinse, ca urmare a deficienţelor de conţinut, nu se returnează.

Titlul şi autorii

Titlul trebuie să fie cât mai scurt şi elocvent pentru conţinutul manuscrisului. Titlul se va scrie cu litere de rând. Numele autorilor vor fi scrise cu litere de rând, prenumele precedând numele, pentru autori prescurtat, pentru autoare întreg. Afilierea va cuprinde instituţia (Universitate şi Facultate/Spital) şi compartimentul (Departament/Disciplină/Secţie) pentru fiecare autor. Autorii sunt obligaţi să menţioneze autorul desemnat pentru corespondenţă, cu datele de contact (e-mail şi telefon).

Rezumatul

Rezumatul va conţine:	**Recomandări speciale**
* Obiectivele clare ale studiului	* *Extrageţi elementele principale din fiecare etapă a studiului pentru a fi expuse cât mai concentrat*
* Descrierea materialului şi metodelor utilizate (concis şi clar)	În rezumat **NU** vor fi incluse:
* Rezultatele obţinute (cele mai importante, exprimate, dacă este posibil, numeric şi evaluate statistic)	* tabele, figuri sau note bibliografice * informaţii care nu sunt prezentate în studiu
* Concluziile cele mai importante şi semnificaţia lor ştiinţifică	* mai mult de 200 de cuvinte

Întrucât rezumatele în limba engleză au o circulaţie internaţională, redactarea lor trebuie să fie conform normelor internaţionale. Rezumatul va fi precedat de titlul articolului, tradus în limba engleză, scris cu majuscule, urmat de cuvântul (Abstract), conform următorului model:

NEUROLOGICAL MANIFESTATIONS IN COLAGEN DISEASES (Abstract) : Colagen disease are ... (urmează textul scris în continuare, fără aliniate). La sfârşitul rezumatului în limba engleză se vor menţiona obligatoriu, cu majuscule, cuvintele-cheie (3 până la 5), în conformitate cu INDEX MEDICUS şi MEDLINE.

Subtitlurile din cuprinsul articolului trebuie scrise cu litere capitale.

Figurile şi tabelele trebuie inserate echilibrat în text. Fiecare figură sau tabel trebuie să fie însoţite de titlu şi legendă.

Figurile, numerotate cu cifre arabe, vor avea o lăţime de 6,5 cm (pentru a se încadra pe o coloană) sau de 13,5 cm (pentru a se încadra pe ambele coloane) şi vor fi menţionate în text în paranteză cu caractere drepte (fig. 1). Figurile trebuie să îndeplinească următoarele condiţii :

- fotografii scanate la o rezoluţie de minim 300 dpi şi prelucrate ulterior pe calculator, fişier original (*.TIFF, *.JPG) ;
- imagini (desene, grafice) realizate pe calculator, menţionate în text, fişier original (*.XLS, *.CDR).

Titlul şi legenda figurilor vor fi scrise conform modelului :

Fig. 2. Rezultatele clonării moleculare

Tabelele, numerotate cu cifre romane, menţionate în text în paranteze (tab. III), vor fi inserate în text şi vor avea o lăţime de 6,5 cm sau de 13,5 cm, fără să depăşească lăţimea unei pagini. Titlul tabelului va fi poziţionat deasupra tabelului conform modelului :

TABELUL III

Date analitice comparative

Bibliografia

Referinţele bibliografice trebuie numerotate cu cifre arabe *în ordinea apariţiei în text* (deci *nu în ordine alfabetică*). Bibliografia va fi plasată la sfârşitul articolului şi va cuprinde numai referinţele citate în text (prin menţionarea în paranteză a numărului referinţei). Abrevierea titlurilor revistelor se va face conform Index Medicus.

Dacă un articol are maximum 6 autori vor fi transcrise toate numele. În cazul în care sunt 7 sau mai mulţi autori, se vor menţiona doar numele primilor 3 autori la care se adaugă abrevierea et al.

Sunt acceptate următoarele forme de scriere a bibliografiei :

Articole din reviste :

Amura SG. Neurotransmitter transportor : recent progress. *Ann Rev Neurosci* 1993 ; 16 : 73-93.

Tonis PJ, von Sandick JW, Nieweg OE et al. The hidden sentinel node in breast cancer. *Eur J Nucl Med* 2002 ; 29 : 305-311.

Cărţi :

Titlul unei cărţi :

Ashcroft FM. *Ion Channels and Disease*. San Diego, London : Academic Press, 2000.

Capitol dintr-o carte :

Pandiom MR, Fischer DA. Immunoradiometric assays. In : Scabes CG editor. *Handbook of Endocrine Research Techniques*. New York, London : Academic Press, 1993, 26-52.

Pentru alte situaţii se va consulta site-ul : *www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html*

TRIMIREA MANUSCRISULUI

Manuscrisele, în dublu exemplar, tipărite pe foi A4, pe o singură faţă cu lăţimea paginii de 13,5 cm, vor fi depuse la Redacţia Revistei Medico-Chirurgicale sau trimise prin poştă pe adresa Societăţii de Medici şi Naturalişti Iaşi, însoţite de formatul electronic, pe disketă sau CD-Rom, menţionându-se procesorul de text folosit (de preferinţă Word).

COPYRIGHT

Acceptarea articolului pentru publicare implică asumarea transferului dreptului de proprietate intelectuală al autorilor asupra revistei. Formularul pentru copyright va fi semnat de autorul desemnat pentru corespondenţă.

ÎN ATENŢIA AUTORILOR

Deoarece este necesară contribuţia materială a autorilor la cheltuielile de editare şi tipărire ale Revistei Medico-Chirurgicale, începând cu numărul 1/2008 se impun următoarele condiţii :

1. Membrii cotizanţi ai Societăţii de Medici şi Naturalişti Iaşi pot publica articole fără achitarea unei taxe.
2. Autorii care nu sunt membri cotizanţi ai Societăţii de Medici şi Naturalişti Iaşi vor achita o taxă de 50 RON în contul RO72RNCB0175033604340001, chitanţa fiind prezentată odată cu depunerea articolului.

Universitatea de Medicină şi Farmacie „Gr. T. Popa" Iaşi